

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie
Direktor: Prof. Dr. med. Steffen Emmert

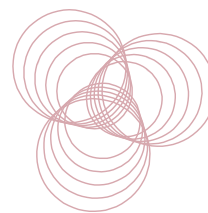
Die Lupine als hochwertiger Eiweißlieferant
in der gesunden Ernährung –
Evaluierung und Reduzierung der allergenen
Potenziale der *Lupinus angustifolius*

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizinwissenschaften
der Universitätsmedizin Rostock

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio



Universitätsmedizin
Rostock

vorgelegt von Francia Yedid Molina Mártir
geboren am 1. April 1978,
in Tepic Nayarit, Mexiko

Rostock, 2020

Gefördert durch das
Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF)
„PlantsProFood“
(Projekt Akten Nr. TRI-070703085910)

Gutachter:

Prof. Dr. med. Steffen Emmert

Universitätsmedizin Rostock, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie

Prof. Dr.med. Karin Kraft

Universitätsmedizin Rostock, Zentrum für Innere Medizin, Lehrstuhl für Naturheilkunde

Prof. Dr. med. Martin Mempel

Hautarztpraxis Elmshorn, FA für Dermatologie, Allergologie Infektiologie, Med. Tumorthherapie

Fachgebundene Labordiagnostik Berufsdermatologie (ABD)

Jahr der Einreichung: 2018

Jahr der Verteidigung: 2021

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Dazu habe ich keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Francia Yedid Molina Mártir

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Steffen Emmert (Klinik für Dermatologie und Venerologie der Universität Rostock) für sein Engagement bei der Betreuung, der Hilfsbereitschaft und fachlichen Beratung sowie für seine außerordentliche Unterstützung, die maßgeblich zum Abschluß meiner Arbeit beitrugen.

Die Arbeit habe ich an der Universitäts-Frauenklinik des Klinikums Südstadt (Direktor: Prof. Dr. Gerber) durchgeführt. Hier bedanke ich mich bei Herrn Prof. Briesse für die Überlassung des Themas und seine Unterstützung bis zu seinem Eintritt in den Ruhestand. In Ermangelung einer Nachfolgebetreuung ergab sich daher der Übertrag meiner Arbeit an Prof. Emmert.

Ich bedanke mich bei dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des Projektes „PlantsProFood“ (Projekt Akten Nr. TRI-070703085910) für die finanzielle Unterstützung. Viel zu verdanken habe ich Herrn Dr. Stefan Mikkat vom Proteom Zentrum der Universität Rostock für die Unterstützung bei der massenspektrophotometrischen Identifizierung der Proteine.

Auch der Praxis von Dr. med. Maren Hoene (Fachärztin für Dermatologie, Rostock) und der Praxis von Dr. med. Christoph Kreiker (Facharzt für Innere Medizin, Pneumologie, Lüneburg) gilt mein Dank für die Bereitstellung des Humanserums.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Martin Rösel (Theologische Fakultät, Universität Rostock) für sein altruistisches Engagement, Unterstützung und motivierenden Worte.

Marlen Szewczyk danke ich für ihre außerordentliche Hilfsbereitschaft, konstruktive und enge Zusammenarbeit, ebenso Franz Markert für die Unterstützung bei der Statistik.

A mi querida amiga la señora Julia Gauck por su ayuda incondicional, sus palabras motivadoras y el tiempo compartido, muchísimas gracias. De la misma manera le agradezco a mi querida amiga la señora Marianne Gauck por su apoyo tanto en la corrección de éste trabajo como en lo moral y en todos los aspectos; a ambas por su eterna presencia, muchísimas gracias.

A mis amigos y familia tanto mexicana como alemana por el apoyo incondicional, por creer y confiar en mí en todos los aspectos, de todo corazón miles de gracias.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Danksagung	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Zusammenfassung	XI
1 Einleitung.....	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Allergische Erkrankungen	1
1.3 Nahrungsmittelallergien	3
1.4 Die IgE-vermittelte Soforttypreaktion (Typ I)	5
1.5 Kreuzreaktionen.....	9
1.6 Die Blaue Süßlupine „ <i>Lupinus angustifolius</i> “	10
1.6.1 Nutzung der Lupinensamen in der menschlichen Ernährung.....	11
1.6.2 Lupinenallergene.....	11
1.6.3 Lupinen assoziierte Lebensmittelallergien	12
1.7 Einfluss technologischer Verfahren.....	13
1.8 Zielstellung.....	14
2 Materialien.....	16
2.1 Verwendetes Pflanzenmaterial	16
2.1.1 Lupinenisolat, Lupinenfasern, Lupinenflocken	16
2.2 Patientenseren.....	16
2.3 Enzyme, Puffer, Lösungen, Kits, Zellen	17
2.4 Laborgeräte.....	19
3 Methoden	21
3.1 Proteinextraktion	21
3.2 Proteinbestimmung	21
3.3 Elektrophorese.....	21
3.3.1 Eindimensionale Gelelektrophorese.....	21

3.3.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese	23
3.4	Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen	23
3.5	Semidry-Immunoblot.....	24
3.6	Unspezifische Färbungen	25
3.6.1	Ponceau S Färbung	26
3.6.2	Kolloidale Coomassie-Färbung	26
3.7	Proteinmodifikationen	26
3.7.1	Hitzebehandlung	27
3.7.1.1	Hitze-Hochdruck-Behandlung	27
3.7.1.2	Thermische-Behandlungen	28
3.7.2	Harnstoff-Behandlung	28
3.7.3	Reduktion/Alkylierung-Behandlung	28
3.7.4	Aktivkohle – Behandlung.....	29
3.7.5	Tanninbehandlung	30
3.8	Proteinstabilitätsuntersuchung	30
3.9	<i>in silico</i> – Kreuzallergenitätsuntersuchung	31
3.10	Enzymallergosorbent-Test (EAST).....	33
3.11	EAST Inhibition	34
3.12	Ausschluss des zytotoxischen Potenzials an normalen humanen Leberzellen (Hepatozyten).....	35
3.12.1	LDH-Zytotoxizitätstest	36
3.12.2	Metabolische Untersuchungen	38
3.13	Statistik.....	39
4	Ergebnisse	40
4.1	Charakterisierung der Patientenseren.....	40
4.1.1	Charakterisierung mittels EAST	40
4.1.2	Charakterisierung mittels Immunoblot.....	40
4.2	Proteingehalte der verwendeten Lupinenfraktionen und dessen Allergenes Potenzial	42
4.3	Proteincharakterisierung 1D SDS PAGE und 2D SDS PAGE.....	43
4.3.1	Eindimensional SDS-PAGE	44
4.3.2	Proteinidentifizierung der Lupinenmehlisolate aus der 1D SDS PAGE	44
4.3.3	Zweidimensionale SDS PAGE	47
4.3.4	Proteinidentifikation MALDI/TOF-TOF	49
4.4	Proteinmodifikationen	51
4.4.1	Einfluss von Erhitzungsprozessen auf die Allergene der Lupinenproteine	51

4.4.2	Harnstoffbehandlung.....	54
4.4.3	Reduktion/Alkylierung	55
4.4.4	Aktivkohlebehandlung	56
4.4.5	Tanninbehandlung	58
4.5	Proteinstabilitätsuntersuchung	60
4.5.1	<i>in vitro</i> Verdau	60
4.5.2	Quantifizierung des relativen allergenen Potenzials der Proteinextrakte nach enzymatischem Verdau	62
4.6	<i>in silico</i> -Kreuzallergenitätsuntersuchung	64
4.7	Zytotoxizitätsuntersuchung	65
4.7.1	Ausschluss der Zytotoxizität von Lupinen unter Verwendung von normalen humanen Leberzellen (Hepatozyten)	65
4.7.2	LDH Zytotoxizitätstest	65
5	Diskussion	67
5.1	Allergen Charakterisierung und Identifizierung	67
5.2	Kreuzreaktionen mit anderen Leguminosen	69
5.3	Einfluss technologischer Verfahren	71
5.4	Untersuchung zur Stabilität der Lupinenproteine und dessen allergenen Potenzial....	75
5.5	<i>in silico</i> -Sequenzanalyse.....	77
5.6	Zytotoxizitätsuntersuchung	78
5.6.1	Wirkung der Proteinisolate auf die Harnstoff-und Albuminsynthese	78
6	Ausblick	79
7	Literaturverzeichnis	80
8	Anhang	IX
8.1	Proteinbestimmung	IX
8.2	Enzymallergosorbent-Test (EAST) Durchführung	XI
8.3	Enzymallergosorbent-Test (EAST).....	XIII
8.4	<i>in silico</i> Untersuchung Daten	XVI
8.5	Metabolische Untersuchungen.....	XXVII
	Ethikvotum Bewertung	XXX

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Einteilung der Unverträglichkeitsreaktionen nach den Empfehlungen der EAACI	3
Abb. 2: Aufbau von Antikörper.....	6
Abb. 3: Antigen-Antikörper-Bindung	6
Abb. 4: Phase der Sensibilisierung	8
Abb. 5: Phase der Manifestation	8
Abb. 6: <i>Lupinus angustifolius</i> und ihre Samen	10
Abb. 7: Übersicht der Arbeitsplan.	15
Abb. 8: Prinzip des Enzymallergosorbent-Testes (EAST).....	34
Abb. 9:Prinzip des LDH Zytotoxizitätstest	37
Abb. 10: Immunoblot von Lupinenmehlisolat unter Verwendung der Einzelseren.	41
Abb. 11: Proteingehalt in [%] der verwendeten Proteinfractionen.	42
Abb. 13: 1D SDS PAGE des Lupinenmehlisolates	44
Abb. 14: Conglutin Expression der gesamten Lupinenproteine, <i>Lupinus angustifolius</i> , mittels 1D SDS PAGE.....	46
Abb. 15: Conglutin α und β Expression der <i>Lupinus angustifolius</i> bestimmt mittels 1D SDS PAGE.....	46
Abb. 16. Immunoblot zur Identifizierung der Lupinenallergene.	47
Abb. 17: 2D SDS PAGE der Lupinenproteinen.....	48
Abb. 18: Gesamte Conglutin Expression der Lupinenproteine (<i>Lupinus angustifolius</i>) mittels 2D SDS-PAGEund MALDI-TOF.	50
Abb. 19: Conglutin α und β Expression mittels 2D SDS-PAGE und MALDI-TOF der <i>Lupinus angustifolius</i>	50
Abb. 20: Proteingehalt in [%] der Lupinenextrakte nach Hitzebehandlung im Autoklav und im Trockenschrank in unterschiedlichen Zeitintervallen.....	52
Abb. 21: Gesamtproteinmuster des erhitzten Lupinenmehls im Ofen und im Autoklav.	52
Abb. 22: A) EAST Inhibition des Lupinenmehlisolats als Kontrolle und des autoklavierten Lupinenmehls. B) Immunoblot des Lupinenmehlisolates	53
Abb. 23 Proteingehalt in [%] der Lupinenextrakte nach Hitzebehandlung im Autoklav und im Trockenschrank in unterschiedlichen Zeitintervallen.....	54

Abb. 24: A) SDS PAGE der Lupinenproteine sowie Lupinenproteine die mit Harnstoff behandelt wurden.	55
Abb. 25: Proteingehalt in [%] der Lupinenextrakte nach Reduktion und Alkylierung.	55
Abb. 26: SDS-PAGE und Immunoblot der Lupinenproteine und Lupinenproteinmodifikationen die Reduziert und Alkyliert wurden.	56
Abb. 27: Proteingehalt der Lupinenproteine nach Koinkubation mit Aktivkohle (AC) in [%].	57
Abb. 28: A) SDS PAGE der Lupinenproteine und Lupinenproteine, die mit Aktivkohle AC koinkubiert wurden.	58
Abb. 29: 1D SDS-PAGE der behandelten Lupinenallergene mit Tanninsäure.	59
Abb. 30: Immunoblot der mit Tanninsäure behandelten Lupinenallergene.	59
Abb. 31: Quantifizierung des allergenen Potenzials des Lupinenmehlisolates als Kontrolle und des mit Tanninsäure	60
Abb. 32: A) Proteingehalt in [%] des Lupinenmehls nach enzymatischem Verdau mit Trypsin und Pepsin. B) Proteingehalt des Lupinenmehls nach enzymatischem Verdau mit Trypsin und Pepsin ohne Kontrollwert.	62
Abb. 33: EAST-Inhibition der Lupinenproteine nach enzymatischem Verdau mit Trypsin und Pepsin.	63
Abb. 34: A) SDS-PAGE der verdauten Lupinenproteine mittels Trypsin und Pepsin.	64
Abb. 35: Zytotoxizitätstest mit humanen Leberzellen.	66

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Pathogene Immunreaktionen nach Coombs und Gell.....	2
Tab. 2: EAST Klassen der verwendeten Humanserum.....	17
Tab. 3: Verwendeten Enzyme, Puffer, Lösungen, Kits und Zellen.....	17
Tab. 4: Verwendete Laborgeräte und dessen Firma.....	19
Tab. 5: Zusammensetzung der SDS PAGE-Gele.....	22
Tab. 6: Einteilung der EAST-Klassen.....	49
Tab. 7: Verwendete Protein-Fraktionen und Konzentrationen für den LDH-Test.....	35
Tab. 8: EAST Klasse der verwendeten Patientenserum.....	40
Tab. 9: Zusammensetzung des Poolserums.....	42
Tab. 10: Proteinbanden der Lupinenmehlisolat mittels 1D SDS PAGE.....	45
Tab. 11: Conglutinfamilien und dessen Isoformen.....	49
Tab. 12: Proteinidentifikation der 2D SDS PAGE.....	50
Tab. 13: Ergebnisse des <i>in silico</i> -Vergleichs der Lupinenproteinen.....	65

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
AC	Aktivkohle
ACN	Acetonitril
AG	Antigen
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APZ	antigenpräsentierende Zelle
Aqua bidest	doppeldestilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BSA	Bovines Serum Albumin
CA	Conalbumin
CBB	Coomassie-Brilliant-Blue
CBI	Centre de Biochimie Structurale
CHAPS	(3-[3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propansulfonat)
CV	Variationskoeffizient
DBPCFC	doppeltblinder placebo-kontrollierter Expositions-Test
DC	dendritische Zelle
DTT	Dithiothreitol
EAACI	Europäische Akademie für Allergologie und Klinische Immunologie
EAST	Enzymallergosorbent-Test
EBI	European Bioinformatics Institute
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
Fab Fragmente	Fragment antigen binding
Fc-Fragmente	Fragment crystallin
FKS	Fötales Kälberserum
GM	Gewichtsmarker
GMP	Gentechnisch modifizierte Pflanze
h	Stunde
HCl	Salzsäure
IB	Immunoblot
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEFM	IEF-Marker
IgE	Immunglobulin E
IUIS	International Union of Immunological Societies
kDa	Kilodalton
LDH	Lactatdehydrogenase
LMA	Lebensmittelallergie
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation
MG	Molekulargewicht
MHC	Major Histocompatibility complex
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MTP	Mikrotiterplatte

MW	Mittelwert
n	Numerus (Anzahl der Messungen)
NaOH	Natronlauge
NC	Nitrocellulose
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NSB	nicht spezifische Bindung
nsLTP	unspezifischen Lipidtransfer-Proteine
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlosung
pI	isoelektrischer Punkt
PIR	Protein Information Ressource
PMF	Peptide Mass Fingerprint
PVDF	Poly-vinyl-di-fluorid
RT	Raumtemperatur
SDAP	Sequence Database of Allergenic Proteins
SDS	Sodium-dodecyl-sulphate
SGF	Simulierter gastrische Flüssigkeit
T	Temperatur
TA	Tannic acid (Tanninsäure)
TBST	Tris-gepufferte Saline mit 0,05% Tween
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TFA	Trifluoressigsäure
TOF	Time-Of-Flight
Tris	Tris[hydroxymethyl]aminomethan
TS	Trockensubstanz
TSP	Total soluble protein (gesamtlösliche Protein)
ü.N.	über Nacht

Zusammenfassung

Im Bündnis PlantsProFood haben sich Unternehmen aus der Agrar- und Lebensmittelindustrie, sowie Forschungseinrichtungen der Universität Rostock zusammengeschlossen. Der Fokus des Bündnisses PlantsProFood lag in der Gewinnung neuer Lebensmittelzutaten aus heimischen Rohstoffressourcen der Blauen Süßlupine (*Lupinus angustifolius*). Im Rahmen des BMBF geförderten Projektes »Entwicklung einer Anlage zur Aufbereitung und Extraktion von Lupinensamen sowie zur Modifikation von Proteinisolaten« ist es gelungen, die Lupinenallergene zu identifizieren und zu charakterisieren, sowie einige Proteinmodifikationen vorzunehmen. Ziel war, das allergene Potenzial zu reduzieren und Kreuzallergenitäten zu untersuchen. Die Nahrungsmittelallergie mit der sich die vorliegende Arbeit befasst, ist eine IgE vermittelte Soforttypreaktion.

Kleine Pilotstudien haben ergeben, dass 34 % der Probanden mit einer bekannten Erdnussallergie auch allergisch auf Lupineneiweiße reagieren. Kasuistische Anaphylaxieberichte zur Lupinenallergie liegen vor [22]. Damit sind Lupinenallergene aus allergologischer Sicht ein relevantes Problem.

Inhalt dieser Arbeit war es, die *Lupinus angustifolius*, Sorte Boregine, auf das Vorhandensein potenzieller Lupinenallergene bzw. kreuzreagierender Leguminosenallergene mittels immunologischer und massenspektrometrischer Verfahren zu evaluieren. Die Allergene der Lupine sind in die Speicherproteine α , β , γ , und δ Conglutin unterteilt. Basierend auf Transkriptionsanalysen war β die häufigste Conglutin Familie, gefolgt von α , γ und δ - Conglutin [52].

Um das allergene Potenzial der Blauen Süßlupine zu senken, wurden verschiedene Modifikationen durchgeführt, z.B. Reduzierung und Alkylierung, Urea-, Hitze-, Hitze-Hochdruck-, Aktivkohle- und Tanninsäurebehandlung. Durch diese Modifikationen konnte festgestellt werden, dass die Lupineneiweiße stabil sind. Sie sind hitzeresistent und können einen enzymatischen Verdau überstehen. Eine Eliminierung bzw. signifikante Reduzierung der Allergenität ist nicht erreicht worden. Darüber hinaus erfolgte eine *in silico*-Untersuchung durch die eine Homologie mit anderen Leguminosen festgestellt werden konnte. So zeigte sich, dass in Einzelfällen alle verwendeten Leguminoseproteine sowie mit diesen verwandte Proteine mit der Blauen Süßlupine eine klinisch relevante Kreuzreaktion verursachen können.

Im *in vitro* Versuch ließen weder das Lupinenisolat noch seine Fraktionen (Lupinenfaser und Lupinenflocken) eine Zytotoxizität auf Leberzellen erkennen.

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Dieser Arbeit entstand auf der Grundlage eines BMBF Projektes in Zusammenarbeit mit dem Bündnis PlantsProFood.

Projekt Akten Nr. TRI-070703085910

Projekttitel: Die Lupine als hochwertiger Eiweißlieferant in der gesunden Ernährung – Evaluierung und Reduzierung der allergenen Potenziale der *Lupinus angustifolius*

1.2 Allergische Erkrankungen

Bereits Hippokrates (geboren um 460 v. Chr.) erwähnt allergische Reaktionen auf Milch und aus dem 15. Jahrhundert sind Todesfälle aufgrund von Allergien auf Ei und Fisch überliefert. Heute sind 2-8 % aller Säuglinge und ca. 2 % der Erwachsenen von einer Lebensmittelallergie betroffen. So hat sich in den USA z.B. die Anzahl von Menschen mit Erdnussallergien in den letzten Jahren um das Doppelte erhöht und die Zahl der Lebensmittelallergiker ist angestiegen. Die Ursache hierfür ist trotz umfassender Forschung noch weitgehend ungeklärt [30, 219].

Den Begriff „Allergie“ definierte erstmals Clemens von Pirquet (1906) als eine „veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine Fremdschubstanz zu reagieren“ Heute ist die Allergie in einem viel engeren Sinne von der World Allergy Organization (WAO) als „hypersensitive Reaktion durch spezifische immunologische Mechanismen“ konkretisiert worden [84]. Darunter ist eine verstärkte spezifische Abwehrreaktion gegenüber an sich harmlosen Substanzen im Sinne einer krankmachenden Überempfindlichkeitsreaktion zu verstehen. Allergieauslösende Substanzen werden als Allergene bezeichnet [148]. Die Intensität der Überempfindlichkeitsreaktion nimmt bei wiederholter Exposition mit dem Allergen meist zu [174].

Nach Gell und Coombs (Tab. 1) werden allergische Reaktionen je nach beteiligten Antigenen und Immunreaktionen in 4 Typen eingeteilt: Immunglobulin E (IgE)-vermittelte Soforttypreaktion (Typ I), zytotoxische Reaktion (Typ II), Immunkomplexreaktion (Typ III) und zellvermittelte Spättypreaktion (Typ IV). Die ersten drei Typen werden durch Antikörper vermittelt, der vierte ist antikörperunabhängig und beruht auf einer T-Zell und Makrophagenreaktion [174].

Tab. 1: Pathogene Immunreaktionen nach Coombs und Gell [55].

Typ der Immunreaktion	Effektoren	Folgen	Klinische Beispiele
I: anaphylaktisch	IgE; Mastzellen, basophile Zellen, TH2 (IL4)	Allergie	Nahrungsmittelallergie, Insektengiftallergie, Asthma bronchiale, einige Formen von Urtikaria, Schock
II: zytotoxisch	IgG, Komplement	Autoimmunität, Infektanfälligkeit, Blutungsneigung	Morbus Basedow, postinfektiöse Myokarditis, Medikamentenunverträglichkeit
III: Immunkomplex vermittelt	lösliche Immunkomplexe, Komplement, FcR-tragende Zellen	Überempfindlichkeit, Autoimmunität	Serumkrankheiten, Farmerlunge, Kollagenosen, Glomerulonephritis
IV: zellvermittelt	Makrophagenaktivierung durch TH1, Eosinophilaktivierung durch TH2	Überempfindlichkeit, Autoimmunität	Rheumatoarthritis, Multiple Sklerose, Diabetes mellitus, Kontaktdermatitis, Glutensensitive Enteropathie, Asthma-Spätphasen-Reaktion

Es hat den Anschein, dass die Zahl von Lebensmittelallergikern in der westlichen Bevölkerung in den letzten Jahren rapide gestiegen ist. Das ist jedoch unwahrscheinlich. Eher wird im heutigen Sprachgebrauch der Begriff Allergie nicht in seiner fachlich korrekten Definition verwendet. So werden z. B. toxische Reaktionen, spezifische Intoleranzreaktionen und pseudoallergische Reaktionen fälschlicherweise als Lebensmittelallergie bezeichnet [184, 215]. Grund für diese mangelnde Abgrenzung zu den unterschiedlichen Lebensmittelunverträglichkeitsreaktionen ist die aufwendige Diagnostik. Die Symptome einer Lebensmittelallergie zeichnen sich vor allem an der Haut, den Schleimhäuten sowie dem Respirations- und Gastrointestinaltrakt ab [215]. Außerdem kann es zu zeitlich verzögerten Symptomen wie Diarrhoe oder Urticaria sowie zu anaphylaktischen Reaktionen kommen [70, 149, 156, 197]. Die Europäische Akademie für Allergologie und klinische Immunologie (EAACI) hat die Unverträglichkeitsreaktionen nach Nahrungsaufnahme in pathogenetische Gesichtspunkte eingeteilt (Abb. 1). So wird innerhalb der nicht-toxischen immunologischen Reaktionen zwischen IgE-medierten und nicht-IgE-medierten Nahrungsmittelallergien unterschieden.

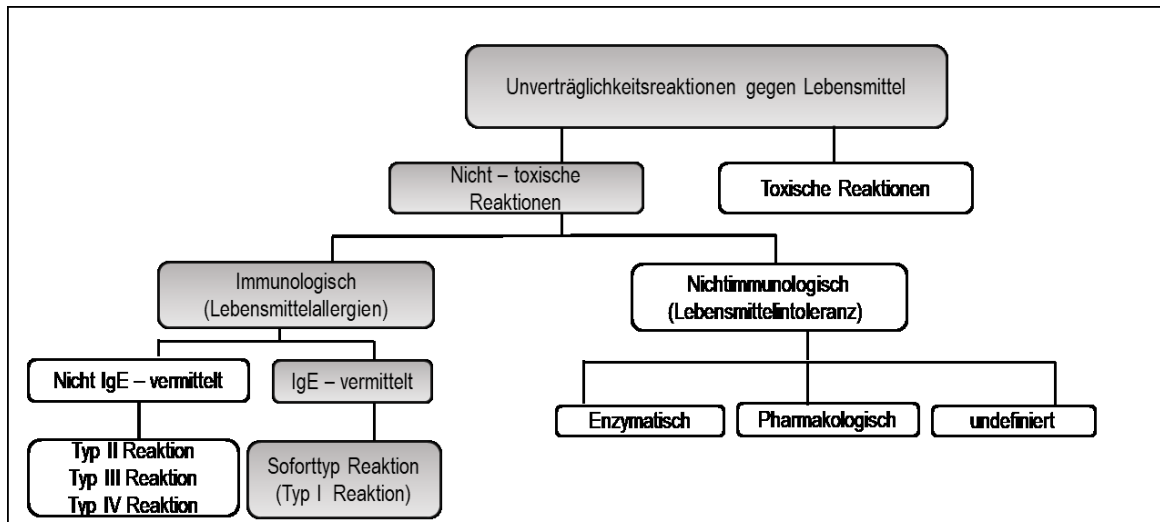


Abb. 1: Modifiziert nach: Einteilung der Unverträglichkeitsreaktionen nach den Empfehlungen der Europäische Akademie für Allergologie und klinische Immunologie (EAACI) [21].

Eine Unterscheidung zwischen psychosomatischen und physiologischen Reaktionen auf Lebensmittel und Additiva (Zusatzstoffe) ist mit keiner wissenschaftlichen Methode möglich. Die Begriffe Lebensmittelallergie- oder intoleranz sollten aus diesem Grunde unbedingt von psychosomatischen Mechanismen abgegrenzt werden [130, 152].

Toxische Reaktionen sind vor allem Durchfälle oder Erbrechen, welche typischerweise nach dem Verzehr verdorbener oder giftiger Speisen eintreten. Ursache hierfür sind Toxine, welche in giftigen Pflanzen (z.B. giftige Pilze) oder durch bakteriellen Befall kontaminierten Speisen vorkommen [152, 185].

1.3 Nahrungsmittelallergien

Der Begriff Lebensmittel- oder Nahrungsmittelallergie wird oft falsch verwendet. So werden Unverträglichkeitsreaktionen auf Nahrungsmittel, unspezifische Intoleranzerscheinungen oder persönliche Aversionen gegen bestimmte Lebensmittel diesem Begriff gleichgesetzt. Eine echte Nahrungsmittelallergie ist jedoch eine immunologisch bedingte Reaktion auf bestimmte Inhaltstoffe von Lebensmitteln. So haben beispielsweise Umfragen in England ergeben, dass ca. 20 % der Bevölkerung der Meinung sind, sie hätten eine Nahrungsmittelallergie oder eine Form von Nahrungsmittelintoleranz. Nachfolgende Untersuchungen (double blind, placebo controlled food challenge) [199] zeigten aber, dass von diesen Personen lediglich ca. 19 % betroffen sind. Die Prävalenz abgesicherter Nahrungsmittelallergien liegt bei 3 % der Erwachsenen und bei 6 – 8 % der Kinder [157]. Kinder reagieren meist allergisch nach dem Verzehr von Kuhmilch (2,5 %), Hühnerei (1,3 %), Erdnuss (0,8 %), Weizen (0,4 %), Soja (0,4 %), Baumnüsse (0,2 %), Fisch (0,1 %) und Meeresfrüchte (0,1 %) [216]. Zu 80 % verschwinden die Allergien auf Kuhmilch,

Hühnerei, Soja und Weizen mit dem Schulalter. Allergien bei Erwachsenen treten oft bei Obst und Gemüse (5 %), Meeresfrüchten (2 %), Erdnüssen (0,6 %), Baumnüssen (0,5 %) und Fisch (0,4 %) auf [169, 216]. Die Allergieentwicklung vom Säuglings- bis zum Erwachsenenalter wird als „Allergischer Marsch“ bezeichnet [81]. Sensibilisierungen im Säuglingsalter sind oft Vorboten anderer allergischer Erkrankungen wie Neurodermitis, Heuschnupfen oder Asthma [169].

Für die Allergenität von Lebensmitteln und Pflanzenpollen hauptverantwortliche Substanzen haben meist Proteinstrukturen. Bei Allergenen handelt es sich hauptsächlich um wasserlösliche Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 und 70 kDa. Da einige Abbauprodukte von Proteinen, z. B. Peptidfragmente teilweise die Allergenität der nativen Proteine behalten, sind sie ebenfalls als Allergene zu betrachten [43]. Nach Allergenkontakt können sowohl lokal also auch systemisch allergische Reaktionen auftreten [55]. Bestätigte Lebensmittelallergien sind gekennzeichnet durch die Produktion von IgE-Immunglobulinen und ein Zusammenwirken von verschiedenen Zelltypen und chemischen Mediatoren [214]. Dieser Typ der allergischen Reaktion wird als Soforttypallergie oder Typ-I-Überempfindlichkeitsreaktion bezeichnet. Charakteristisch dafür sind Symptome, die unmittelbar nach Allergenkontakt auftreten. Als mögliche Reaktionen der IgE-medierten Allergie sind das orale Allergie-Syndrom, Gastroenteritis (lokale Reaktionen) und allergische Urtikaria, Quincke-Ödem, allergische Rhinitis und Asthma und Anaphylaxie bis hin zum anaphylaktischen Schock (systemische Reaktionen) zu nennen [164, 214].

Abhängig von dem Sensibilisierungsweg können Nahrungsmittelallergien in zwei Kategorien (Klasse I und Klasse II) unterteilt werden. Die Klasse-I-Nahrungsmittelallergie entsteht nach direkter Sensibilisierung über Hautkontakt oder den Magen-Darm-Trakt. Typische Klasse-I-Nahrungsmittel-allergene sind Erdnuss, Weizen, Fisch, Kuhmilch und Sojabohne. Die Klasse-II-Nahrungsmittelallergie ist das Ergebnis einer sekundären Sensibilisierung auf kreuzreaktive Allergene [16, 20]. Ein Beispiel wäre die Birkenpollen-Allergie, welche letztendlich zum Latex-Frucht-Syndrom führen kann.

Die Sensibilisierung auf Klasse-II-Allergene ist die Folge einer primären Sensibilisierung gegen Inhalationsallergene (Pollenallergene). Nachdem der Organismus sich gegen das strukturverwandte Pollenallergen sensibilisiert hat, können auch Nahrungsmittelallergene durch eine Kreuzreaktion allergische Symptome auslösen [148]. Bekannt ist, dass 50-93 % der Birkenpollenallergiker unter IgE-vermittelten Reaktionen nach dem Verzehr der pollenassoziierten Nahrungsmittel [183] leiden. Hauptverantwortlich hierfür ist das Major-Allergen des Birkenpollens (*Betula verrucosa*) Bet v 1 mit seinen verwandten Allergenen in pflanzlichen Lebensmitteln [72]. Die meisten Nahrungsmittelallergene gehören zur Klasse I, die oft durch Hitze, Säuren und Proteasen ihre allergene

Potenz nicht verlieren [155, 216]. Aufgrund ihrer Stabilität können diese Nahrungsmittelallergene möglicherweise entweder in intakter Form über die Darmschleimhaut aufgenommen werden oder ihre IgE-bindenden Epitope sind sequenziell. Eine Sensibilisierung gegen Klasse-I-Allergene ist meist mit einer schweren Symptomatik verbunden. Alle Nahrungsmittelallergien im Kindesalter sind durch Klasse-I-Allergene bedingt [20, 148]. Die allergene Potenz von Klasse-II-Allergenen wird häufig durch Hitzeeinwirkung oder Enzymverdau zerstört. Vermutlich handelt es sich bei den IgE-bindenden Epitopen bei Klasse II-Allergenen hauptsächlich um Konformationsepitope [157].

1.4 Die IgE-vermittelte Soforttypreaktion (Typ I)

Eine maßgebliche Rolle bei der Soforttyp-Reaktion spielt der Antikörper IgE (Abb. 2). Über die Aktivierung von B-Lymphozyten, die zu Plasmazellen reifen und der daraus resultierenden Produktion spezifischer IgE Antikörper bzw. direkt über eine Aktivierung der T-Lymphozyten wird eine spezifische Immunantwort generiert [145, 215], indem die Antikörper an Rezeptoren der Mastzellen binden und bei erneutem Antigenkontakt die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren initiieren. Erhöhte IgE-Serumkonzentrationen werden daher als Hinweis auf eine atopische Erkrankung gewertet [87, 88]. Im menschlichen Organismus gibt es fünf Ig-Isoformen in vier Polypeptidketten: zwei schwere und zwei leichte Ketten. Beide Ketten bestehen aus zwei gut gegeneinander abgegrenzten Bereichen: einer variablen und einer konstanten Domäne, die den Hauptteil der schweren Kette darstellt. Die Bildung intramolekularer Disulfidbrücken führt zur Stabilisierung der Ketten untereinander und zum Aufbau von Kettenschlaufen, die wesentlich für die dreidimensionale „Y“-Struktur des Moleküls sind [215]. Ein Antikörper hat also zwei „Fab“-Fragmente (fragment antigen binding), die variable und konstante Domänen aufweisen und ein „Fc“-Fragmente (fragment crystallin), das nur aus der konstanten schweren Kette besteht. Die einzelnen Isoformen können durch Ladung, Molekulargewicht, Kohlenhydratanteil, Aminosäuresequenz und ihre Funktion unterschieden werden (Abb. 3) [215]. Die Spezifität der Antikörper zu ihren Antigenen entsteht durch die differierenden Aminosäuresequenzen der variablen Domäne, auch als Paratop bezeichnet. Die Funktionalität des Antikörpers wird durch eine für jede der fünf Ig-Isoformen unveränderliche Sequenz der „Fc“-Fragmente bestimmt. IgE weist im Gegensatz zu den Isoformen IgG, IgM, IgA und IgD fünf anstelle von vier konstanten Domänen in diesem Bereich auf [113,174, 175, 215]. Infolge der Antigen-Antikörper-Reaktion (Abb. 3) der IgE-Moleküle auf den Mastzellen kommt es zu einer allergischen Reaktion. Das Allergen muss dazu mindestens zwei frei zugängliche spezifische Bindungsstellen (sogenannte Epitope) aufweisen. Strukturbedingt werden Epitope eingeteilt in Sequenzepitope, welche ausschließlich über die kontinuierliche Abfolge von bis zu 20 Aminosäuren (AS) charakterisiert sind und Konformationsepitope, welche über ihre räumliche Gestaltung in Form von Sekundär- und Tertiärstruktur determiniert sind [47,58] .

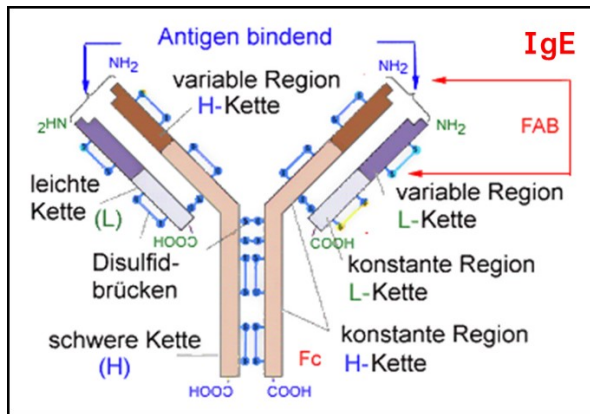


Abb. 2: Aufbau von Antikörper [202].

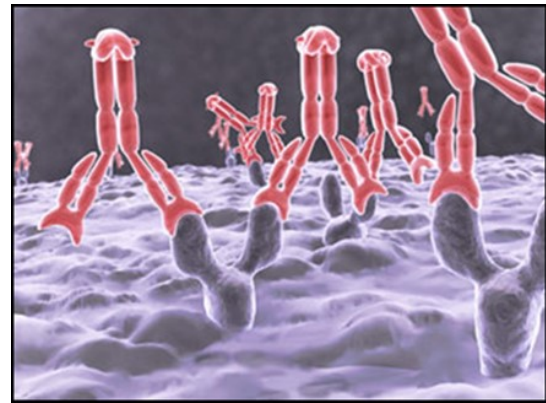


Abb. 3: Antigen-Antikörper-Bindung [202].

Die Pathogenese der Typ-I-Allergie weist ein Ungleichgewicht bei den T-Helferzellen auf. Von diesen Zellen existieren mehrere Subpopulationen (TH1-, TH2-, TH17-Zellen und Treg) die sich in ihrem Zytokinspektrum voneinander abgrenzen. Abhängig vom Mikromilieu produzieren die antigenpräsentierenden Zellen (APZ) verschiedene Zytokine. Es erfolgt eine TH2-Immunantwort mit einem Überschuss an TH2-Reaktion bei abgeschwächter TH1-Reaktion und eine exzessive Produktion von allergenspezifischen IgE-Antikörpern [161, 216]. Diese Antwort ist in eine Sensibilisierungs- und eine Manifestationsphase unterteilt. Die Sensibilisierungsphase startet mit einem ersten Allergenkontakt. Nach der Verarbeitung und Präsentation des Allergens durch APZ endet diese Phase mit der Proliferation spezifisch reaktionsfähiger T-Lymphozyten und der Produktion allergenspezifischer Antikörper durch B-Lymphozyten [81, 216]. TH2-Zellen sezernieren unter anderem Interleukine IL-4 und IL-13, die maßgeblich an der Bildung von allergenspezifischem IgE beteiligt sind. IgE bindet an hochaffine FcεRI Rezeptoren auf Effektorzellen (z.B. Mastzellen und basophile Granulozyten) und an niedrigaffine FcεRII Rezeptoren auf Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Eosinophilen und Thrombozyten [143]. Nach einem weiteren Kontakt (Manifestationsphase) mit dem Allergen kommt es zur Kreuzvernetzung von FcεRI-gebundenen IgE-Molekülen. Als Folge werden Mediatoren (Histamin, Prostaglandine, Leukotriene) durch Exozytose frei, welche für das Auftreten der allergischen Symptome verantwortlich sind. Trotz Verdauung und Prozessierung der Nahrungsmittelproteine im Magen-Darm-Trakt besteht die Möglichkeit der Allergenaufnahme über diesen Weg [80]. Resorbierte Allergene werden von Antigen präsäsentierenden Zellen (APZ) aufgenommen und prozessiert. Die professionellen APZ sind überwiegend dendritische Zellen (DC). In den APZ erfolgt der Abbau der Allergene zu Peptiden von ca. 7-15 Aminosäuren. Diese Bruchstücke werden an die Zelloberfläche transportiert und zusammen mit MHC Klasse II-Strukturen den T-Helferzellen präsentiert. Die APZ sezernieren humorale Faktoren, die für die Aktivierung der T-Helferzellen erforderlich sind. Bei Allergien vom Soforttyp oder

antiparasitärer Abwehr führt das im hohen Maße zur Aktivierung von TH2-Zellen und damit zur IL-4 Ausschüttung führt. Nehmen die APZ virale oder bakterielle Komponenten auf, kommt es zu einer besonders starken Synthese von Interleukin-12 (IL-12), was zu einer Differenzierung von T-Zellen zu TH1-Zellen führt [19, 214]. Vier bis zwanzig Stunden nach der IgE-vermittelten Mastzelldegranulation nach Allergenkontakt und der Ausschüttung von Mediatoren kommt es zur Spätphasenreaktion der Typ-I-Allergie. Während dieser Phase werden Entzündungszellen, vor allem Eosinophile, angelockt, deren Sekret an toxischen Molekülen für lokale Gewebeschäden sorgt [164].

Wird der Organismus erneut dem Allergen ausgesetzt, kommt es in Sekundenschnelle zu einer allergischen Reaktion. Diese, als akute Phase bezeichnete Reaktionskaskade, ist vereinfacht in Abb. 4 und 5 dargestellt. Sie beginnt mit der Bindung des Epitops des Allergens [1] an die Paratope von IgE-Molekülen, welche an der Oberfläche von Makrophagen [2] gebunden vorliegen. Durch eine Überbrückung (bridging) [3] zweier zellgebundener IgE Moleküle kommt es zur Oberflächendeformation der basophilen Granulozyten, wodurch eine Aktivierung von Enzymen der Zellmembran hervorgerufen wird. Als Konsequenz erfolgt daraufhin die Freisetzung von in den zytoplasmatischen Granula der Mastzelle gespeicherten Effektormolekülen durch eine degranulierende Exozytose [4]. Vor allem vasoaktive Amine wie Histamin und Serotonin sowie inflammatorische Lipide wie Prostaglandine und Leukotriene sind hierbei zu nennen. Neben der Fähigkeit, allergische Reaktionen zu initiieren, penetrieren sie zusätzlich die Blutgefäße und lösen dort die Bildung von Adhäsionsmolekülen [5] aus, die sowohl auf den Mediatoren selbst als auch auf den Endothelzellen [6] haften können. Die zirkulierenden Immunzellen [7] des Blutes wie z.B. basophile Granulocyten bleiben dadurch zunächst an den Endothelzellen haften und treten mit Hilfe der Adhäsionsmoleküle als diffundierende Immunzellen [8] in die umgebende Gewebeschicht ein, wodurch weitere Mediatoren freigesetzt werden. Die IgE-vermittelte Aktivierung der Mastzellen löst über diesen Mechanismus eine entscheidende Kaskade von Entzündungsreaktionen aus.

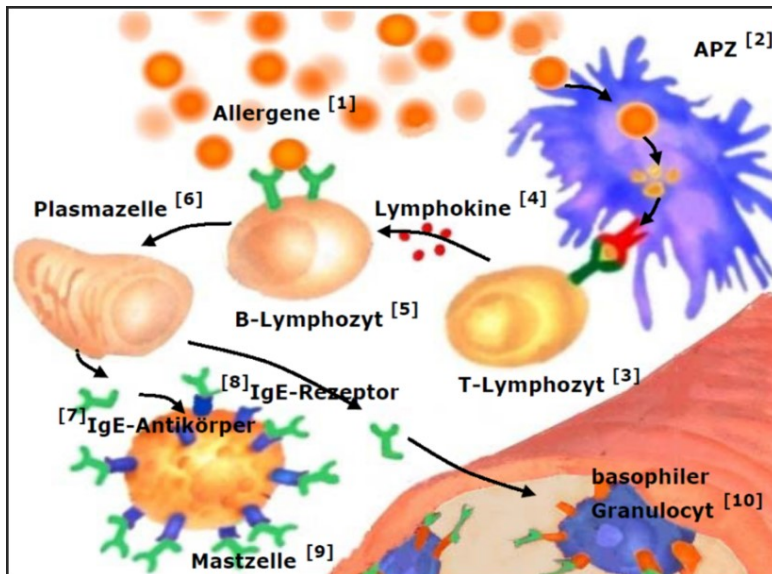


Abb. 4: Phase der Sensibilisierung [187]. Die Sensibilisierung wird durch die Aufnahme und Spaltung der Allergene [1] durch Makrophagen eingeleitet. Dabei entstehende Fragmente werden an der Oberfläche der Makrophagen, welche als Antigen präsentierende Zellen [2] fungieren, den T-Lymphozyten [3] offeriert. Die Erkennung der Fragmente löst die Freisetzung von Lymphokinen aus [4], dadurch erfolgt eine Ausreifung der B-Lymphozyten [5] zu Plasmazellen [6]. Es kommt zu einer Ausscheidung von IgE-Antikörpern [7]. Diese binden sich über einen langen Zeitraum an IgE-Rezeptoren [8] von Mastzellen [9] und an basophile Granulozyten [10].

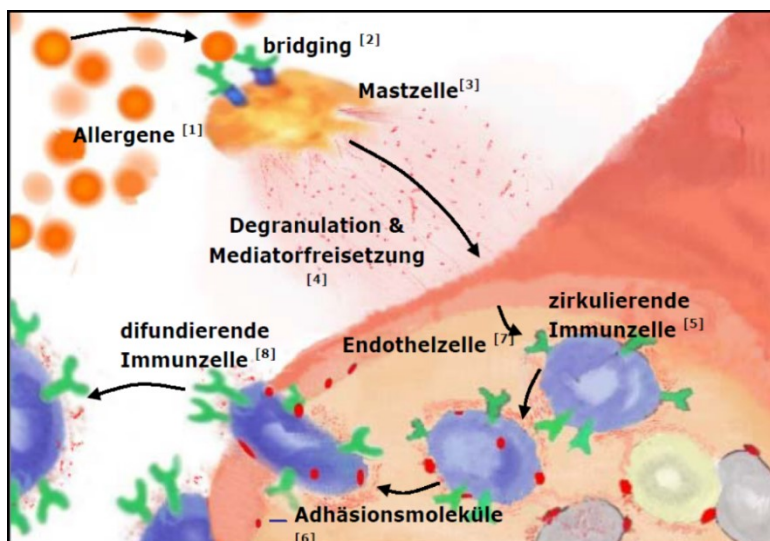


Abb. 5: Phase der Manifestation [187]. Der erneute Kontakt eines bereits sensibilisierten Organismus mit dem Allergen [1] führt zur Überbrückung „bridging“ [2] von zwei auf einer Mastzelle [3] lokalisierten IgE Antikörpern nach Bindung des Allergens an diesen. Durch die resultierende Deformation der Mastzellenoberfläche werden Mediatoren freigesetzt [4], welche nach Eintritt in die Blutgefäße die Bildung von Adhäsionsmolekülen [6] induzieren. Sie haften an Mediatoren und Endothelzellen [7] und bewirken eine Diffusion [8] von zirkulierenden Immunzellen [5] in umliegendes Gewebe.

1.5 Kreuzreaktionen

Immunologische Kreuzreaktionen sind bei Jugendlichen und Erwachsenen die häufigste Ursache für Nahrungsmittelallergie. Die Grundlage für die Zunahme von IgE-vermittelte Nahrungsmittelallergien im Erwachsenenalter sind kreuzreagierende Allergene. Ähnliche Molekülstrukturen in Inhalations- und Nahrungsmittelallergenen bedingen die Bildung kreuzreagierender IgE-Antikörper. Damit wird infolge der primären Sensibilisierung gegen ein Kreuzallergen, meist ein Inhalationsallergen, ein ganzes Spektrum an Sensibilisierungen ausgelöst. Bereits der Erstkontakt mit dem Nahrungsmittel kann eine anaphylaktische Reaktion provozieren. Die größte Bedeutung haben pollenassoziierte Nahrungsmittelallergien, wobei die baumpollenassoziierten Allergien am besten untersucht sind [71].

Angesichts der Zunahme der Pollenallergien, der Verschiebung der Sensibilisierungsspektren und einer Änderung unserer Essgewohnheiten muss mit neuen, bisher unbekannten Kreuzreaktionen gerechnet werden.

Die Prävalenz für die Ausbildung einer Allergie gegen ein bestimmtes Nahrungsmittel ist nicht nur in den Altersgruppen unterschiedlich, sondern auch von regionalen Unterschieden, lokalen Ernährungsgewohnheiten und der Verarbeitung des Lebensmittels abhängig. So spielen z.B. Erdnüsse als Allergene in Amerika eine bedeutendere Rolle als in anderen Kontinenten. Dies beruht vor allem durch den frühen mengenhaften Konsum von Erdnüssen z.B. in Form von Erdnussbutter [154].

Mit der Globalisierung ist mit einer Zunahme von Kreuzreaktionen zu rechnen, weil oft „neue“ Lebensmittel konsumiert werden, die früher nicht zur Verfügung standen z.B. Mango, Kiwi, Litschi, Bananen, Papaya, neue Apfelsorten usw. Kreuzallergien treten durch hoch konservierte Proteine mehrerer Allergenquellen geringer phylogenetischer Verwandtschaft auf. Entscheidend ist hierbei die Ähnlichkeit der Bindungsepitope der Antigene bzw. Allergene. Bei einer Aminosäuresequenzidentität von unter 50 % wird vielfach keine klinisch relevante Kreuzreaktion vermutet. Dies wird aber widerlegt, denn z.B. die Hauptallergene Api g 1 aus Sellerie und Dau c 1 aus Karotte weisen weniger als 40 % Sequenzidentität mit Bet v 1 aus Birkenpollen auf. Jedoch ist auch hier eine Kreuzreaktivität nachweisbar [71, 152]. Betroffene sind oftmals gegen eine ganze Familie von Früchten allergisch.

Welche Lebensmittel Allergien auslösen, variiert stark von Land zu Land. Unterschiedliche Häufigkeiten hängen von der Ernährung der Bevölkerung ab. Das Risiko, gegen ein bestimmtes Lebensmittel sensibilisiert zu werden, steigt mit dem Konsum. Allergien gegen Erdnüsse und Nüsse treten häufig in England, den USA und Skandinavien auf, während in Frankreich Eier und

Meeresfrüchte die Hauptauslöser eines anaphylaktischen Schocks sind. In der Schweiz wiederum spielt Sellerie eine große Rolle [219]. Das beruht auf der Homologie von Sellerieallergenen mit Pollenallergenen. Eine Allergie gegen Pfirsiche tritt vorwiegend in Ländern wie Spanien, Portugal und Italien auf [24, 44].

1.6 Die Blaue Süßlupine „*Lupinus angustifolius*“

Die Gattung *Lupinus* gehört botanisch zur Ordnung der Schmetterlingsblütler (Fabales) und innerhalb der Familie Leguminosae oder Fabaceae (Hülsenfrüchtler) zum Tribus *Genisteae* und umfasst je nach Klassifikationskriterien bis zu 400 Spezies [77, 138, 217].

Die Verwendungsmöglichkeiten in der menschlichen Ernährung der Wildarten der Lupine waren sehr eingeschränkt, da diese einen hohen Anteil an bitteren und toxischen Alkaloiden beinhalten [217]. In den Jahren 1927 bis 1929 gelang es von Sengbusch alkaloidarme Lupinenarten ($< 0,02\%$ Alkaloide), sog. Süßlupinen, zu züchten [67]. Diese Sorten können nun ohne Bedenken als Nahrungsmittel genutzt werden [77, 146]. Insbesondere *L. angustifolius* sorte Boregine hat einen geringeren Alkaloidgehalt als andere Sorten. Für den Anbau in Deutschland gibt es drei Lupinenarten, die nach ihrer Blütenfarbe benannt werden: die Gelbe (*Lupinus luteus*), die Blaue (*Lupinus angustifolius*) Abb. 6 und die Weiße Lupine (*Lupinus albus*). Die drei Arten unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe, Verwertungsmöglichkeiten sowie Ansprüche an Boden und Klima.



Abb. 6: *Lupinus angustifolius* und ihre Samen [202, 203].

Im Vergleich mit anderen Leguminosen fällt bei Lupinen ein geringerer Stärke- jedoch sehr hoher Lipid- und Proteingehalt (bis zu $40,0\%$) auf [57, 217]. Der Stärkegehalt im Samen der *L. angustifolius* beträgt weniger als 15 g/kg in der Trockensubstanz (TS) [57]. Der Lipidgehalt variiert je nach Lupinenspezies zwischen 4 und 15% und setzt sich bei *L. angustifolius* zusammen aus: Triglyceriden (7%), Phospholipiden ($14,9\%$), freien Sterolen ($5,2\%$), Glykolipiden ($3,5\%$), freien Fettsäuren und Wachsestern ($0,9\%$). Typischerweise ist in Lupinen ein hoher Gehalt an

ungesättigten Fetten ~75 % mit überwiegendem Anteil an Öl- und Linolsäure vorzufinden [138]. Desweiteren enthält die Pflanze Wasser (12 %), Phytinsäure (1 %) und Vitamine. Zudem sind noch folgende Inhaltsstoffe in der *L. angustifolius*: Niacin (40,0 mg/kg TS), Carotine (3,9 mg/kg TS), Thiamin (5,9 mg/kg TS), Riboflavin (3,1 mg/kg TS), Cholin (3,4 mg/kg TS) und α -Tocopherol (2,4 mg/kg TS), und kleinere Mengen an Biotin, Pantothen- und Folsäure [57, 139, 217]. In den Kotyledonen (Keimblättern) werden Globuline (~85 %) und Albumine (5 – 12 %) in einem Verhältnis von 9:1 [42, 217] gebildet. Dies sind die Speicherproteine der Lupinensamen. Die Hauptspeicherproteine (Globuline) sind im wässrigen Medium löslich. Durch schrittweise Erhöhung der Salzkonzentration des Lösungsmittels lassen sich die Globuline in 12 verschiedene Komponenten aufteilen [42]. Aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Globulinkomponenten (Assoziation und Dissoziation) werden vier Hauptglobuline definiert: Conglutin α , β , γ und δ [42, 217].

1.6.1 Nutzung der Lupinensamen in der menschlichen Ernährung

Das Interesse, Lupinenprodukte für die Lebensmittelindustrie zu nutzen, steigt aufgrund der wertvollen Pflanzeninhaltsstoffe und den günstigen Rohstoffkosten stetig. Zudem wächst die Nachfrage nach pflanzlichen Proteinpräparaten aufgrund der Nachhaltigkeitsdebatte und eines gesteigerten Gesundheitsbewusstseins der Konsumenten [150]. Die Lupinensaat enthält gesundheitsfördernde Inhaltsstoffe und weist für die Lebensmittelverarbeitung positive technofunktionelle Eigenschaften auf, wie z. B. Emulgier- und Schaumverhalten sowie Wasserbindungs- und Geliervermögen [13, 217]. Erhältliche Produkte aus Lupine sind Snacks, Nudeln, Brot, Kuchen, Kaffee, Eiscreme, Joghurt, Brotaufstriche, Babynahrung, Fleisch- oder Tofuersatz und Instantmehle [50, 89, 97, 217].

Die Samen der gezüchteten Süßlupine haben günstige ernährungsphysiologische Eigenschaften. Sie sind kalorienarm und mineralstoffreich, reich an Eiweiß und Ballaststoffen sowie arm an verdaulichen Kohlenhydraten. Der Gehalt an Harnsäure bildenden Purinen ist bei Lupinen sehr gering, und sie sind cholesterinfrei.

Das allergene Potential der Lupinenproteine wird debattiert, da Kreuzreaktionen mit Allergenen aus Sojabohnen, Erdnüssen, grünen Bohnen und Erbsen möglich sind [101, 166, 217].

1.6.2 Lupinenallergene

Die Allergene der Lupine sind die Speicherproteine α , β , γ , und δ Conglutin. 2008 wurde das β Conglutin der Spezies *Lupinus angustifolius* von der IUIS (International Union of Immunological Societies) zum Allergen *Lup an 1* ernannt. Es handelt sich um ein 7 S Globulin [82, 219]. Holden et

al. zeigten 2008 mit Hilfe des Immunoblots und eines ELISAs, dass α Conglutin eine hohe Bindungsaffinität zu IgE von lupinensensibilisierten Patienten hat [76]. Aufgrund der großen Homologien in der Aminosäuresequenz und der Struktur der Proteine kann die Kreuzallergie zwischen Erdnuss und Lupine erklärt werden [219]. Das Erdnussallergen Ara h 2 und Lupinenallergene der Familie PR-10 weisen beispielsweise eine hohe Ähnlichkeit auf. [61, 219]. 2011 haben Foley et al. auf der molekularen Ebene die Speicherproteine der *Lupinus angustifolius* isoliert und sequenziert. Sie haben insgesamt 16 Mitglieder der Conglutinfamilie identifiziert. 11 davon wurden vorher noch nicht beschrieben. Sie haben 2 α (α 2 - 3), 5 β (β 3 - 7), 1 γ (γ 2) und 3 δ Conglutinsequenzen (δ 2 – 4) neu identifiziert. Basierend auf ihren Transkriptionsanalysen war β - (56 %) die häufigste Conglutin Familie, gefolgt von α - (24 %), γ - (15 %) und δ - (6 %) Conglutin [52]. Dass die Summe der Prozentangaben 101 ergibt, ist wahrscheinlich Rundungsfehlern zuzurechnen, die sich aber aus der zitierten Publikation nicht mehr nachvollziehen lassen

Personen, die auf Erdnüsse und Lupinen allergisch sind, reagieren möglicherweise zusätzlich auf andere Proteine als solche Personen, die ausschließlich auf Lupine allergisch reagieren.

Monoklonale Antikörper gegen Lupinenproteine wurden generiert und charakterisiert. Die fünf monoklonale Antikörper reagierten auf die vorherrschende Art von Speicherproteinen (Globuline) in Lupine. Zwei der Antikörper erkannten α Conglutin, die restlichen 3 erkannten β Conglutin [39].

1.6.3 Lupinen assoziierte Lebensmittelallergien

Aufgrund schwerwiegender allergischer Reaktionen auf Lupinenprodukte hat das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) die Häufigkeit der Verwendung von Lupinenprodukten in Lebensmitteln und das Auftreten von Überempfindlichkeitsreaktionen gegen Lupinen beschrieben [22]. Der erste veröffentlichte Fallbericht war ein 5-jähriges Kind mit bereits bestehender Erdnussallergie, das eine generalisierte Urtikaria mit Angioödem nach der Aufnahme von lupinenmehlhaltigen Teigwaren entwickelt [82]. Seitdem hat sich die Zahl der Berichte über allergische Reaktionen von Lupinenmehl, -Samen oder -Staub erhöht [82].

Problematisch sind Lupinenprodukte, wie Lupinenmehl, wenn sie aufgrund ihrer geschmacklichen oder frischhaltenden Eigenschaften in sehr geringen Mengen Lebensmitteln beigemischt werden [22]. Es liegen bereits Fälle vor, in denen es nach dem Verzehr von Pizza oder Lebkuchen, deren Teigmischungen Lupinenmehl als Zutat enthielten, zu Hautreaktionen, Atemproblemen, Krämpfen oder sogar einer lebensbedrohlichen allergischen Überempfindlichkeit (anaphylaktischer Schock) kam [222]. Wegen dieses besonderen allergenen Potenzials fällt die Lupine unter die EU-Kennzeichnungspflicht für Allergene. Die Richtlinie 2006/142/EG vom 22. Dezember 2006 legt fest,

dass bei Verwendung von Lupinen und Lupinenerzeugnisse als Lebensmittel, diese als Zutaten gekennzeichnet werden müssen [22].

Die Lupinenallergie hat zahlreiche Symptome, die von oralen Allergie-Syndromen, Entzündungen der Nasenschleimhaut und der Bindehaut (Rhinokonjunktivitis), Lippen- oder anderen Ödemen, Nesselausschlag (Urtikaria), Atemnot (Laryngospasmus, Dyspnoe, asthmatischen Anfällen), Bauchschmerzen und Übelkeit bis zum anaphylaktischen Schock reichen [22].

1.7 Einfluss technologischer Verfahren

Eine erhebliche Beeinflussung von Lebensmittelproteinen findet durch deren technologische Verarbeitung statt, was zu einer Veränderung der Allergenität führen kann [215]. Es kann durch mögliche Denaturierungen zur Veränderung der Konformation oder zum Abbau von Proteinen kommen. Hieraus kann sich einerseits eine Verminderung der Allergenität durch Zerstörung bzw. sterische Hinderung von zuvor vorhandenen Epitopen ergeben. Andererseits kann auch eine Erhöhung des allergenen Potenzials durch Ausbildung neuer Epitope in Folge räumlicher Änderungen der Proteinstruktur bzw. durch Freilegung zuvor schwer zugänglicher Bereiche eintreten [182]. Neben der thermischen Behandlung als wichtigstem technologischen Verfahren spielen die Lagerung, der Einfluss von Enzymen und mechanische Energie eine Rolle. Des Weiteren können Bestrahlung, gentechnische Veränderungen sowie Schutz- und Starterkulturen einen Einfluss auf das allergene Potenzial eines Lebensmittels haben [182].

Hypoallergene Isoformen und Varianten können natürlich vorkommen bzw. wurden diese durch Störung der konformationsbindenden Epitope erzeugt. Die Entstehung ist aber auch durch chemische Modifizierung oder Gentechnik möglich [180, 189].

Einen Schwerpunkt sowohl in der technologischen Verarbeitung als auch der küchentechnischen Zubereitung stellt die thermische Behandlung dar. Die Erhitzung von Lebensmitteln kann das allergene Potenzial sowohl steigern als auch vermindern. Es kommt zu Veränderungen der Epitopstruktur durch lebensmitteltechnologische Verfahren, wie Blanchieren, Pasteurisieren, Autoklavieren, Trocknen, Rösten oder Extrudieren, als auch Mikrowellenerhitzung oder Kochen [215]. Sie führen zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Denaturierung der Proteine. Manche Allergene besitzen jedoch eine hohe Hitzestabilität [182].

Alvarez-Alvarez et al., haben die allergenen Eigenschaften von Lupinensamen nach dem Kochen, Autoklavieren, Mikrowellenerhitzung und Kochextrusion untersucht. Es wurde eine Verringerung der Allergenität nach dem Autoklavieren bei 138 °C für 20 min beobachtet. Dabei entstanden minimale Änderungen auf dem SDS-PAGE-Proteinprofil und der IgE-Bindungskapazität. Bisher gibt es nur

wenige systematische Untersuchungen über thermische Prozessparameter, die möglicherweise auch Einfluss auf die Allergenität von Leguminosenallergenen [12, 26, 91, 123, 167] haben. Einige seien hier genannt. Beyer et al. zeigten beispielsweise, dass die Verfahren des Bratens und Siedens der Erdnüsse im Vergleich zum Rösten (was höhere Temperaturen erfordert) zu reduzierten IgE-Bindungsintensitäten bei den wichtigsten Erdnussallergenen (Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3) führen [12]. Das Sieden von Linsensamen führte zu erheblichen Veränderungen im elektrophoretischen Bandenmuster, wie Ibanez-Sandin et al. und Sanchez-Monge herausfanden [79, 158]. Daraus lässt sich ableiten, dass thermische Verarbeitungsverfahren unter verschiedenen Temperaturen und Bedingungen unvorhersehbare Auswirkungen auf die allergenen Aktivitäten haben. Desweiteren ist es notwendig, systemische Untersuchungen hinsichtlich neuer Inhaltsstoffe zu testen. Dadurch werden Informationen und eine genaue Risikoanalyse für Patienten ermöglicht.

1.8 Zielstellung

Der Ersatz tierischer Eiweiße durch pflanzliche Proteine in den Nahrungsmitteln ist an ein mögliches Allergierisiko gebunden. Durch die Einführung von „neuen“ Lebensmitteln können neue Allergien entstehen. Dafür ist die Charakterisierung und Identifizierung der Allergene notwendig.

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Charakterisierung sowie Untersuchung zur möglichen Abschwächung des allergenen Potenzials von Lupineneiweißen. Mittels *in vitro*-Testen wurde geprüft, inwieweit das allergische Potenzial unter Laborbedingungen reduziert werden kann. Unter der Grundsatzbetrachtung, dass Proteine bzw. deren Bestandteile allergen wirken können, sollte durch ein BMBF-Projekt untersucht werden, wie dieses Gefährdungspotenzial weitestgehend zu minimieren ist.

In der Abb. 7 ist die Übersicht dieser Arbeit dargestellt. Untersucht wurden die Auswirkungen der technologischen Veränderungen auf das allergene Potenzial der blauen Süßlupine: α -, β -, γ - und δ Conglutin. Unter Verwendung elektrophoretischer und immunologischer Verfahren, wie Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Isoelektrische Fokussierung (IEF), 2-dimensionale (2D) Elektrophorese und Immunoblot (IB) gelang es im Rahmen dieser Arbeit die Hauptallergene des *Lupinus angustifolius* voneinander zu trennen und anschließend mittels geeigneter allergenspezifischer Färbemethoden zu visualisieren. Zur Identifizierung von den in Lebensmitteln auftretenden Allergenfragmenten bot sich eine Matrix-unterstützte Laser Desorption/Ionisation-Time-Of-Flight² (MALDI-TOF/TOF)-Analyse an. Um eine relative Quantifizierung des allergenen Potenzials technologisch veränderter und nativer Lupinenproteine vorzunehmen, fand der Enzymallergosorbent-Test (EAST)-Inhibition Anwendung.



Abb. 7: Übersicht des Arbeitsplanes. Grün unterlegt sind die geplanten Arbeitsprogramme, die in Abstimmung miteinander sowohl *in-vitro* als auch *in silico* durchgeführt wurde. Die lila unterlegten Bereiche beziehen sich auf das anvisierte Methodenspektrum auf dem Gebiet der Proteinbiochemie. Die geplanten Innovationen auf dem Gebiet der Nahrungsmittelkonfiguration sind hier braun hinterlegt.

2 Materialien

2.1 Verwendetes Pflanzenmaterial

2.1.1 Lupinenisolat, Lupinenfasern, Lupinenflocken

Das in dieser Arbeit verwendete Pflanzenmaterial stammt von der Pflanze *Lupinus angustifolius*, Sorte Boregine, Erntejahr 2010. Die Herstellung des Lupinenmehls erfolgt in Kooperation mit der Firma Prolupin, die unser Projektpartner war. Diese Firma hat aus den Lupinensamen das wertvolle Protein mit einer patentierten schonenden Methode isoliert. Dabei entstanden nicht nur ein Proteinisolat, sondern auch Lupinenfasern und Lupinenflocken. Das Material wurde für die Untersuchung lyophilisiert und im Labor bei -85 °C zwischengelagert.

2.2 Patientenseren

In Zusammenarbeit mit einer Dermatologin Frau Dr. med. Maren Hoene aus Rostock und einem Internisten Herrn Dr. med. Christoph Kreiker (Pneumologe) aus Lüneburg und mit der Serenbank D-Lab Hamburg wurden 13 Patienten mit Hinweis auf eine Sensibilisierung gegen Lupinen, Erdnuss und Soja rekrutiert. Nach Dokumentation der individuellen Anamnese erfolgte eine Blutentnahme. Aus den so gewonnenen Blutproben wurden gemäß Kapitel 6.1 die Patientenseren hergestellt. Anschließend erfolgt die Bestimmung des Gehaltes an spezifischen IgE-Antikörpern gegen Lupinen, Erdnuss und Soja mittels EAST (siehe 3.10) und die Detektion der Allergenbanden im Immunoblot (siehe 3.5) mittels der Einzelseren. Für alle in dieser Arbeit durchzuführenden immunologischen Untersuchungen wurde daraufhin ein Poolserum hergestellt, welches sich aus aliquotierten Volumina jener Seren zusammensetzt die EAST-Klassen ≥ 2 aufwiesen. Die EAST-Klasse ≥ 2 wurde im Immunoblot geprüft. Durch diese Vorgehensweise ergaben sich spezielle Lupinen-Erdnuss-Soja Poolseren, welche sich aus einem breiten Patientenkollektiv mit einer echten Typ-I-Lebensmittelallergie zusammensetzen. Damit ist ein breites Detektionsspektrum für alle durchzuführenden immunologischen Untersuchungen gewährleistet. Die Ergebnisse der untersuchten Einzelseren sowie die Daten eines Kontrollserums mit der EAST-Klasse 0 entsprechen keiner Lebensmittelunverträglichkeit; sie sind der Tab. 2 zu entnehmen.

Tab. 2: EAST Klassen (EKL) der verwendeten Humanseren.

Serum Nummer	EKL Erdnuss	EKL Soja	EKL Lupinen
1	1,1	2	3
2	0	1	3
3	1,2	1,8	2
4	0	1,2	3
5	1,2	1,8	2
6	2	1,9	1,1
7	3	1,7	1
8	3	1,3	1,1
9	4	1,7	1,1
10	5	1,3	0
11	1,3	2,2	0
12	0	2	0
13	1,8	1,8	3,6

2.3 Enzyme, Puffer, Lösungen, Kits, Zellen

Alle verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Carl Roth bezogen.

Tab. 3: Verwendeten Enzyme, Puffer, Lösungen, Kits und Zellen

Puffer und Lösungen für die Proteinbestimmung	
BCA Methode	BCA Protein Assay Kits, Thermo Fisher Scientific, USA
Puffer und Lösungen für die 1D Gelelektrophorese	
Trenngelpuffer	1,5 M Tris $C_4H_{11}NO_3$; pH 8,8
Sammelgelpuffer	1,0 M Tris $C_4H_{11}NO_3$; pH 6,8
SDS-Lösung;	10 % SDS 347 mM $C_{12}H_{25}NaO_4S$
APS-Katalysatorlösung;	10 % Ammoniumpersulfatlösung 438 mM $H_8N_2O_8S_2$
Elektrophoreselaufpuffer:	Rothiphorese 10x SDS-PAGE 25 mM Tris $C_4H_{11}NO_3$;
	192 mM Glycin $C_2H_5NO_2$; 1 % SDSE $C_{12}H_{25}NaO_4S$
Probenpuffer	RotiLoad1
Geltrocknungspuffer	10 % Glycerin $C_3H_8O_3$, 20 % Ethanol C_2H_6O , 70 % A. bidest. Ethanol (absolut) Applichem

Puffer und Lösungen für die 2D Gelelektrophorese	
Rehydrationspuffer	7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2% CHAPS , 18 mM Dithiothreitol (DTT) , 0,5 % IPG -Puffer
SDS Äquilibrationslösung	6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 2 % SDS, 50 mM Tris- HCl pH 8,8 mit 1 % DTT und 4 % Iodacetamid
Complete™ ohne EDTA	gemäß den Anweisungen des Herstellers, Roche
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid (Protease Inhibitor)
Puffer und Lösungen für die massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen MALDI-TOF/TOF	
Waschpuffer	30 % Acetonitril (ACN), 25 mM Ammoniumbicarbonat
	50 % ACN in 10 mM Ammoniumbicarbonat
Proteaselösung	Sequenzierungsgrade Trypsin, 10 ng/µl 3 mM Tris- HCl, pH 8,5, Promega
	5 mM DTT
Extraktionslösung	0,3 % Trifluoressigsäure (TFA) , 50 % ACN
Matrixlösung	9 mg/ml α-Cyano-4 -Hydroxy- Zimtsäure (CHCA) in 50 % ACN, 0,1 % TFA
Puffer und Lösungen für Western-Blot Analysen	
Waschpuffer 10x	TBS-T (1,5 M NaCl, 99 mM Tris, 0,5 % Tween, pH 7,4)
Blocklösung	5 % Magermilchpulver, 1x TBS-T
Anodenpuffer	10 % Anodenpuffer, 20 % Methanol; 70 % A. bidest.
Kathodenpuffer	10 % Kathodenpuffer, 20 % Methanol; 70 % A. bidest.
Immunfärbung	Monoclonal Anti-Human IgE-Alkaline Phosphatase, antibody produced in mouse,
	Clone GE-1, purified immunoglobulin, Sigma-Aldrich, USA
	Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit, Bio Rad, USA
Puffer und Lösungen für die Proteinfärbung	
Ponceau-Färbung	Ponceau-S-Lösung (0,2 % in TCA , 3 % w/v) Boehringer Mannheim, Deutschland
Kolloidale Coomassie-Färbung	Roti-Blue 5x Konzentrat Färbelösung: (60 % A. bidest., 20 % Methanol, 20 % Roti-Blue)
	Waschlösung: 25 % Methanol 99,8 %, 75 % A. bidest.
Geltrocknungspuffer	10 % Glycerin C ₃ H ₈ O ₃ , 20 % Ethanol C ₂ H ₆ O, 70 % A.

	bidest.
Puffer und Lösungen für die Proteinmodifikationen	
Harnstoffbehandlung	0,13 M Tris, pH 9,0; 5,3 M Harnstoff
Reduktion/Alkylierung	0,13 M Tris, pH 9,0; 5,3 M Harnstoff, 28 mM Dithiotreitol, 55,5 mM Iodacetamid
Aktivkohle	20 mM Natriumphosphat Na ₃ PO ₄ , 100 mM NaCl, pH 7,5
Tanninebehandlung	50 mM Na ₃ PO ₄ pH 7,2; PBS pH 2; PBS pH 8
Enzyme und Puffer für die Proteinstabilitätsuntersuchung	
Enzyme	Pepsin, Sigma
Puffer	1mM KCl pH 1,5; 0,2 M NaHCO ₃
Enzyme	Trypsin, Sigma
Puffer	20 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,8
Puffer und Lösungen für die EAST und EAST Inhibitionstest	
	Allergozyme, Spec. IgE ELISA RV 5, Omega Diagnostics GmbH Reinbek, Deutschland
Puffer und Lösungen für die Zytotoxizitätstest	
Lactatdehydrogenase-Test (LDH)	Laktatdehydrogenase (LDH)-Test: Cytotoxicity Detection Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Stopplösung	1 N HCl
Triton-Kontrolle	Triton X-100 (Octoxinol-9); Ferak Berlin GmbH, Deutschland
Zellen	humanen Hepatozyten Fa. Primacyt, Schwerin, Deutschland

2.4 Laborgeräte

Tab. 4: Verwendete Laborgeräte und dessen Firma

Gerät	Firma
Brutschrank „Function Line“	Heraeus Deutschland
Elektrophoresekammer	Phase
ELISA-Fotometer BioRad Modell 680	BioRad Laboratories
Gel Drying Frames 14x14 cm	Diversed Biotech Carl Roth
Gel Safe Electrophoresis Gel Preservation	Carl Roth
Kühlschrank	Liebherr Premium
Mini Zentrifuge VWR	Galaxi MiniStar

Ofen	Heraus Instrument function
pH Meter	Thermo Scientific
Schüttler	Heidolph, Deutschland
Sterilbank Heraeus „Hera safe“	Kendro Laboratory Products
Strom supply „power pac 300“	Bio Rad
Thermo Schüttler „TS100“	Lab4you GmbH
Tiefkühlschrank Sanyo Ultra Low	Ewald Innovationstechnik GmbH
Tisch Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Deutschland
Vortexer Heidolph „Reax 2000“	Heidolph
Waage BP2105	Sartorius, Deutschland
Wasserbad	Memmert
Immunoblot semidry	LTF-Labortechnik
Zentrifuge Hettich „Universal 320 R“	Hettich Zentrifuge

3 Methoden

3.1 Proteinextraktion

- 1 g Lyophilisiertes Mehl aus Lupinenproteinisolat, Fasern und Flocken in einem Mörser fein zermahlen und anschließend in 100 ml in A. bidest resuspendieren.
- Unter Schwenken ü. N. bei 4 °C inkubieren und anschließend 15 min bei 4500 x g zentrifugieren. Der Überstand dekantieren, aliquotieren und bei -20 °C zwischenlagern.

3.2 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung des Gehaltes an löslichen Protein (Total Soluble Protein = TSP) erfolgte mit der Proteinquantifizierungsmethode nach BCA [209].

BCA Methode

Der Bicinchoninsäure-Assay zur Proteinbestimmung ist ein einfacher und schneller photometrischer Assay. Er weist eine höhere Toleranz gegenüber nicht-ionischen Detergenzien und einfachen Puffersalzen auf. Proteine reduzieren alkalisches Cu^{2+} zu Cu^+ . Bicinchoninsäure bildet einen intensiv violetten Komplex mit Kupferionen mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Standardreihe mit bovinem Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 25, 125, 250, 500, 750, 1000, 1500 und 2000 µg/ml.

- 50 µl je Standard, Blank, Probe und 200 µl Farbreagenz in Dreifachbestimmungen in die Kavitäten der 96 Well Mikrotiterplatte pipettieren.
- Nach 30 min Inkubation bei 37 °C und 15 min bei RT die Extinktionen der Ansätze bei 570 nm mit dem Microplate Reader (Bio Rad Model 680) messen. Anhand der Extinktion des Standards ließen sich die Proteinkonzentrationen der Proben berechnen.

3.3 Elektrophorese

3.3.1 Eindimensionale Gelelektrophorese

Mit der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) lassen sich Proteine nach ihrer Molekularmasse trennen. Dazu werden die Proteine mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen und die Disulfidbrücken der Proteine reduktiv mit β-Mercaptoethanol beim Kochen gespalten. Das resultierende Ladungs-Masse-Verhältnis ist für alle Proteine gleich. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgt in sogenannten restriktiven Polyacrylamidgelen im elektrischen Feld. Polyacrylamid besitzt eine hohe chemische und mechanische Stabilität und durch eine Copolymerisation von Acrylamidmonomeren und N, N'-Methylenbisacrylamid gewonnen [214]. Die Proteine sind negativ geladen und wandern in Richtung

Anode. Durch die netzartige Struktur der Gele wandern kleinere Moleküle schneller als die Größeren und somit ist die Wanderungsgeschwindigkeit und zurückgelegte Strecke umgekehrt proportional zur molekularen Masse der Proteine [214]. Die Proteingröße kann anhand von Proteinreferenzmarkern mit definierter Größe bestimmt werden [95].

Herstellung der Gele:

Es wurden 12 %-ige denaturierende SDS Polyacrylamidgele verwendet [95]. Die Zusammensetzung der Gel-Lösungen ist in die Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Zusammensetzung der SDS PAGE-Gele

	12 % Trenngel	5 % Sammelgel
A. bidest. [ml]	6,6	5,5
30 % Acrylamid Mischung [ml]	8	1,3
Tris-HCl pH 8,8 [ml]	5	-
Tris-HCl pH 6,8 [ml]	-	1
10 % SDS [µl]	200	80
10 % APS [µl]	200	80
TEMED [µl]	20	8

Alle Angaben beziehen sich auf 20 ml angesetzte Gellösung der Trenngele und 8 ml der Sammelgele.

Durchführung:

- Die Gekassetten bis zu 2/3 mit der frisch hergestellten Trenngellösung befüllen und mit Isopropanol überschichten. Nach der Polymerisation das Isopropanol entfernen.
- Gel mit A. bidest. spülen und überschüssiges Wasser vorsichtig mit Filterpapier entfernen. Anschließend das Sammelgel auf das Trenngel gießen und sofort ein entsprechender Gelkamm einsetzen.
- Nach Polymerisation Kamm entfernen, die Taschen trocknen und die Elektrophoreseapparatur aufbauen. Parallel dazu Proben vorbereiten.
- Die Proteine für 5 min bei 95 °C denaturieren. Nach dem Befüllen mit Elektrodenpuffer Proben und der Molekulargewichtsmarker (Precision Plus Protein, Biorad) luftblasenfrei in die Geltaschen applizieren und den Lauf starten.
- Der Lauf bis zum Einlaufen der Proben in das Sammelgel bei einer Spannung von 50 V und innerhalb des Trenngeles bei 100-150 V applizieren.

Nach beenden des Elektrophorese-Laufes wurden die Gele entweder einer Färbung zum Sichtbarmachen der Proteine unterzogen oder für einen Proteintransfer auf eine Membran mittels Immunoblot eingesetzt.

3.3.2 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese kombiniert die isoelektrische Fokussierung (IEF) mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Trennung komplexer Proteingemische in Einzelproteine. Durch die Kombination der beiden zueinander ausgeführten Trenntechniken wird eine besonders hochauflösende Trennung erreicht [126].

Diese Untersuchung wurde am Proteomzentrum der Universität Rostock von Herrn Dr. Mikkat durchgeführt.

- 10 mg des Proteinextrakts (Lupinenisolat) sind mit 1 ml Rehydrationspuffer (7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 2 % CHAPS 18 mM Dithiothreitol (DTT) 0,5 % IPG -Puffer) und 8 µl Complete™ ohne EDTA ergänzt und gemischt worden (gemäß den Anweisungen des Herstellers, Roche, Mannheim, Deutschland).
- Anschließend wurden 2 µl PMSF hinzugefügt. Die Probe beim RT für 3 h schütteln und danach beim 13000 rpm beim 4 °C für 20 min abzentrifugieren. Der Überstand beim -20 °C lagern.
- Die Proteinkonzentration unter Verwendung des Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München, Deutschland) ist gemessen worden.
- 100 µg Proteinextrakt sind mit dem Rehydrationspuffer auf ein Gesamtvolumen von 150 µl gemischt und auf IPG-Streifen (7 cm, pH 3 - 10 linearen, GE Healthcare) geladen worden, bevor die Rehydratisierung und isoelektrischen Fokussierung auf einem IPGphor (Amersham Biosciences) durchgeführt wurden.
- Konzentrierte IPG-Streifen in zwei aufeinanderfolgenden Schritten von 20 min in SDS Äquilibrationslösung (6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 2 % SDS, 50 mM Tris- HCl, pH 8,8) mit 1 % DTT und 4 % Iodacetamid jeweils äquilibrieren. Die Zweite dimensionale Trennung wurde auf 4-12 % NuPAGE Bis-Tris-Gele (1,5 mm, 2D-Well, Invitrogen) durchgeführt. Proteine sind durch das Färben mit kolloidalem Coomassie G250 sichtbar [126].

3.4 Massenspektrometrische Identifizierung von Proteinen

Diese Untersuchung wurde am Proteomzentrum der Universität Rostock mit Hilfe von Herrn Dr. Mikkat durchgeführt.

Die Proteinproben wurden manuell aus den Gelen geschnitten und in 96-Well-Platten übertragen. Der In-Gel-Verdau mit Trypsin ist wie beschrieben durchgeführt worden [126].

- Die Gel-Pfropfen zweimal mit 30 % Acetonitril (ACN) in 25 mM Ammoniumbicarbonat, 50 % ACN in 10 mM Ammoniumbicarbonat waschen und bei 37 °C trocknen. Die getrockneten Gel Pfropfen erneut mit 5 µl Proteaselösung quellen (sequencing grade Trypsin, 10 ng/µl 3 mM Tris- HCl, pH 8,5, Promega, Madison, WI, USA) und für 5 - 8 h bei 37 °C inkubieren.
- Die für den Verdau von Proben aus 1D-Gele verwendet Trypsin-Lösung sind mit 5 mM DTT ergänzt worden. Der Verdau durch Zugabe von 5 mg/l Extraktionslösung (0,3 % TFA, 50 % ACN) stoppen und die Proben bei Raumtemperatur für 30-60 min rühren, bevor die Peptidextrakte in die 96-Well-Sammelplatten übertragen werden.
- Die resultierende, Peptid enthaltende, Lösung für die MALDI-Analyse durch den Einsatz von 0,6 µl des tryptischen Verdaus und 0,45 µl Matrixlösung, bestehend aus 9 mg/ml α -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (CHCA) in 50 % ACN 0,1 %, zubereiten (TFA auf Standard-Edelstahl-MALDI-Platten).

Die MALDI-Analysen wurden in einem 4700 Proteomics Analyzer MALDI-TOF/TOF Massenspektrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) durchgeführt. Alle erfassten Spektren sind mit 4000 Series Explorer TM-Software, Version 3.6 (Applied Biosystems) verarbeitet worden. Für die Proteinidentifikation, sind Spitzenlisten bei MASCOT (Version 2.4.0, Matrix Science, London, UK) über die MASCOT Deamon eingereicht. Die Suche ist mit Taxonomiefiltern (Proteine *Viridiplantae* 1.013.315 Sequenzen aus *Viridiplantae* Swall 2012_01) verglichen mit der Proteinsequenz-Datenbank durchgeführt worden. Eine Massentoleranz von 60 ppm und eine Spaltstelle wurden eingestellt. Die Oxidation von Methionin-Reste ist als variable Modifikation berücksichtigt. Die Carbamidomethylierung von Cystein ist als feste Modifikation für Proben von 2D-Gele durchgeführt. Die Peptidmassen der Autoproteolyse-Produkte von Trypsin und die von der Matrix abgeleiteten Peaks wurden ausgeschlossen. Die Identifikationen mit Mascottchen-Protein-Scores größer als 73 waren signifikant ($p < 0,05$) [116].

3.5 Semidry-Immunoblot

Bei der Durchführung eines Immunoblots werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Membran (z.B. Nitrocellulose, NC) transferiert. Nach der Blockierung der freien Bindungsstellen kann eine Immunodetektion bestimmter Proteinbanden durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern erfolgen.

Proteintransfer:

- Im Anschluss an Elektrophorese ungefärbtes Gel mit A. bidest. spülen
- 10 min in Transferpuffer inkubieren
- 6 Lagen Filterpapier (Gel-Blotting-Papier, GB 002, Schleicher & Schuell, Carl Roth, Deutschland) und die Membran (Protran®, Nitrocellulose Transfer Membrane, Schleicher & Schuell, Deutschland) in Größe des Gels zuschneiden
- Je 3 Lagen Filterpapier in Anoden-bzw. Kathodenpuffer inkubieren
- Membran mit A. bidest. spülen und 10 min in Transferpuffer schwenken
- Blot-Apparatur in folgender Reihenfolge aufbauen: Anode, 3 Lagen Filterpapier (Anodenpuffer), Membran, Gel, 3 Lagen Filterpapier (Kathodenpuffer), Kathode
- Stromstärke von 0,8 mA/cm² anlegen, Transferdauer 1 h.

Immunodetektion:

- Blocken der freien Bindungsstellen auf der Membran mit Blocklösung (ü.N. bei 4 °C)
- Membran 3 x 10 min waschen in TBST
- Inkubation mit verdünntem primären Antikörper (Serum 1:10 mit Blocklösung) ü.N. bei 4 °C, anschließend 3 x 10 min waschen in TBST Puffer
- Inkubation mit verdünntem sekundären Antikörper (Verdünnung 1: 5000 Anti-Human IgE Alkaline Phosphatase Konjugate/Blocklösung (ü.N. bei 4 °C oder 2 h RT)
- Membran 3 x 10 min waschen in TBST
- Färbung mit alkalische Phosphatase Konjugate Substrate Kit, Bio Rad, USA

Die Bindungsreaktion erfolgt 1 h bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken. Nach dem Waschen der Membran (3 x 10 min in Waschpuffer) wurden die spezifisch gebundenen Antikörper durch Substratzugabe detektiert. Die Farbentwicklung erfolgt nach etwa 5 – 15 min. Die Reaktion wird durch Zugabe von A. bidest. gestoppt. Die Membran wird zwischen Filterpapieren getrocknet und eingescannt, danach kann die Membran in Folie eingeschweißt werden.

3.6 Unspezifische Färbungen

In Polyacrylamidgelen und NC-Membran können Allergene und nicht-allergene Proteine mit unspezifischen Färbemethoden visualisiert werden. Dafür stehen verschiedene Methoden zur Verfügung [124]. In dieser Arbeit sind die Ponceau Färbung und die Kolloidale Coomassie-Färbung verwendet worden.

3.6.1 Ponceau S Färbung

Der Ponceau S Färbung ist eine reversible Färbung der Proteine auf einer NC-Membran. Diese Färbung dient vor allem dazu, den erfolgreichen Proteintransfer von SDS-Gelen auf NC-Membranen nachzuweisen.

Ponceau S Färbung:

- Membran in Ponceau-S-Lösung eintauchen (1-2 h, schwenken, RT)
- Zum Entfärben in A. bidest. eintauchen bis Banden nicht mehr sichtbar sind

3.6.2 Kolloidale Coomassie-Färbung

Die Kolloidale Coomassie-Färbung ist eine empfindliche reversible Methode zur Proteinfärbung. Mit dieser Färbemethode es ist möglich die Anlagerung des Farbstoffes quantitativ an die Proteine zu binden ohne dass eine Denaturierung erfolgen kann. Eine Entfärbung der Proteinbanden ist ebenfalls möglich. Diese Methode kann somit im Bereich der Proteinisolierung zur Proteinfärbung vor MALDI-TOF/TOF-Messungen [96, 124 ,126] eingesetzt werden.

Färben der Proteine:

Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung:

- Gel in Färbelösung (2-3 h, schwenken, RT)
- Gel in Entfärbelösung (Gel in Waschlösung, schwenken, RT, belassen, bis Hintergrund vollständig entfärbt ist und die Proteinbanden noch deutlich sichtbar sind)

Die Gele können zwischen 2 Cellophan-Papieren mittels Geltrocknungsrahmen, -puffer getrocknet werden, um diese zu konservieren.

3.7 Proteinmodifikationen

Denaturierung bezeichnet alle physikalischen oder chemischen Prozesse, die ein natives Protein so verändern, dass es zum Verlust der biologischen Aktivität oder der spezifischen Eigenschaften kommt, aber die Primärstruktur unverändert bleibt [220].

Die Denaturierung eines Proteins führt zu vielseitigen physikalisch-chemischen Veränderungen. Unter anderem kommt es zu einer Verminderung der Hydratation des Proteins, Löslichkeit und Kristallisationsfähigkeit kann den isoelektrischen Punkt verschieben.

Die Denaturierung von Proteinen kann u.a. durch folgende Modifikationen erreicht werden:

- physikalische Denaturierung
- chemische Denaturierung
- starkes Rühren, Schütteln oder Erhitzen
- UV-, Röntgen- oder Strahlenabsorption
- Ultraschall-Behandlung

- 6-8 M Harnstoff-Lösung (löst H-Brücken)
- extreme pH-Werte (unter 3 oder über 9)
- Detergenzien [220]

Ziel dieser Modifikationen ist es, eine hypoallergene Variante des Lupinenmehls herzustellen. Die verwendeten Modifikationen, bewiesen, dass einige Proteine ihre Stabilität, ihre IgE Reaktivität bzw. ihr allergenes Potenzial verlieren, jedoch die T-Zell Antwort behalten bleibt. Von allen Schritten bzw. Proteinmodifikationen wurde der Proteingehalt bestimmt, ein 1D SDS PAGE, Immunoblot und die EAST-Inhibition durchgeführt um zu beweisen, dass sich das allergene Potenzial vermindert hat.

3.7.1 Hitzebehandlung

3.7.1.1 Hitze-Hochdruck-Behandlung

Studien haben gezeigt, dass das Autoklavieren bzw. Hochdruck das allergene Potenzial einiger Leguminosen wie Soja, Erdnuss, Linse, Kichererbse wesentlich reduzieren kann [33]. Durch Hitzebehandlung kann die Konformation eines Allergens durch den Verlust der Tertiärstruktur und Aggregation verändert werden [11]. Aufgrund unterschiedlicher Hitzebehandlungen treten im Vergleich verschiedener Veröffentlichungen widersprüchliche Aussagen über die Struktur der hitzebehandelten Proteine auf [2, 33, 62, 172]. Neben der thermischen Behandlung als wichtigstes technologisches Verfahren haben die Lagerung, der Einfluss von Enzymen und mechanische Energie einen Einfluss auf die Konformation. Des Weiteren können Bestrahlung, gentechnische Veränderungen sowie Schutz- und Starterkulturen das allergene Potenzial eines Lebensmittels beeinträchtigen [182]. Einen Schwerpunkt sowohl in der technologischen Verarbeitung als auch der küchentechnischen Zubereitung stellt die thermische Behandlung dar, die zu einer Veränderung der Epitopstruktur führen kann.

Autoklavierungs-Parameter

Die gewählten Temperaturstufen von 121 °C bei einer jeweiligen Erhitzungsdauer von 60 min entsprechen nicht den industriell angewandten Parametern zur Konservierung, sondern übersteigen z. T. deutlich die eingesetzten thermischen Belastungen [215]. Durch diesen Versuch soll ein Gesamtüberblick über den Einfluss der Erhitzung auf die Allergenität der Lupine auch unter extremen Bedingungen gewonnen werden. Dabei erfolgt die Auswahl der Temperaturstufe in Anlehnung an die Sterilisierung (121 °C).

- Die Autoklavierung von 100 g Lupinenmehl der Sorte „Boregine“ erfolgte dabei in einem handelsüblichen Laborautoklaven. Die Probe wurde anschließend auf Raumtemperatur heruntergekühlt und bei -20 °C gelagert.

3.7.1.2 Thermische-Behandlungen

Das Lupinen-Proteinisolat mit A. bidest in einem Verhältnis von 1:2 (A. bidest:Protein) mischen

- Nach 5 min Quellen kleine Mengen in Petrischalen überführen und in einem Ofen bei 100, 150 und 200 °C erhitzen. Die Proben verblieben 5, 15 und 30 min im Ofen, danach jede Probe auf RT abkühlen, trocknen und bei -20 °C zwischenlagern.

3.7.2 Harnstoff-Behandlung

Zur Protein-Denaturierung wird häufig die neutrale, wasserlösliche, organische Substanz Harnstoff in einem Konzentrationsbereich von 5-10 M verwendet. Harnstoff ist in der Lage, einige Proteine in eine globuläre, teilweise denaturierte Form zu überführen. Durch die Denaturierung werden Wasserstoffbrückenbindungen gelöst. Ein Ergebnis der Harnstoff-Behandlung ist eine Aggregatbildung der Proteine bis hin zur Ausfällung aus der Lösung. Dies erfolgt, da die im inneren liegenden hydrophoben Aminosäuren in Kontakt mit dem umgebenden (wässrigen) Lösungsmittel kommen und in Wechselwirkungen mit anderer hydrophoben Aminosäuren treten [177, 220]

Harnstoff-Behandlung Durchführung:

- 0,5 g Lupinenmehlisolat in einer 0,13 M Tris Lösung (pH 9,0) resuspendieren und für 1 h bei RT unter Rühren lösen.
- Zur Denaturierung 5,3 mol/l Harnstoff zugeben und 1 h rühren. Anschließend 15 min bei 4500 x g zentrifugieren. Danach die Lösung aliquotieren und bei -20 °C für weitere Untersuchungen wie 1D SDS PAGE und Immunoblot zwischenlagern.

3.7.3 Reduktion/Alkylierung-Behandlung

Für bestimmte Allergene ist das Auflösen von intramolekularen Disulfidbrücken eine geeignete Strategie zur Proteinentfaltung und Verringerung der Allergenität. Im Einklang damit zeigte die C8/S119 Mutante das Milben-Hauptallergen *der f 2* reduzierte Allergenität. Hypoallergen Mutanten unspezifischer Lipidtransferproteine (nsLTP), wie das Parietaria-Pollen-Allergen Par J1, zeigen aufgebrochene Disulfidbrücken durch ortsgerichtete Mutagenese [177].

Disulfid-Bindungen können oxidativ oder reduktiv gespalten werden. Reduktive Spaltungen der Disulfid-Bindungen durch Dithiotreitol fügen sich gewöhnlich besser in die Gesamtstrategie der Primärstrukturanalyse ein. Die reduktive Spaltung wird meist durch Behandlung mit 2-Mercaptoethanol oder Dithiotreitol (Clelands-Reagens) realisiert. Um alle Disulfidgruppen dem reduzierenden Agens zugänglich zu machen, kann die Reaktion in der Regel unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden, wobei die native Konformation zerstört bleibt. Die entstehenden freien Sulfhydrylgruppen werden üblicherweise durch Behandlung mit Iodacetamid alkyliert, um die

Rückbildung der Disulfid-Brücken durch Oxidation mit O₂ zu unterbinden. S-Alkyl-Derivate sind an der Luft und bei den typischen Spaltbedingungen für Peptidbindungen stabil [177].

Reduktion und Alkylierung Durchführung:

- Lupinenmehlisolat zunächst mit Harnstoff (5,3 mol/l und 0,13 mol/l) lösen in Tris - HCl (pH 9,0) denaturieren (siehe Harnstoff-Behandlung).
- Die Reduktion erfolgt unter Zugabe von Dithiotreitol (28 mmol/l) bei 55 °C für 45 min.
- Die folgende Alkylierung mit Iodacetamid mit einer Endkonzentration von 55,5 mmol/l durchführen.
- Der Proteingehalt bestimmen. 1D SDS PAGE, Immunoblot sowie die EAST Inhibition durchführen. Die Proben bei -20 °C zwischenlagern.

3.7.4 Aktivkohle-Behandlung

Die Aktivkohle (AC)-Behandlung auf toxischen Substanzen konnte auch für die Bindung von Lupinenallergenen angewendet werden. Es wurde die Frage geklärt ob eine Allergenitäts-reduzierung möglich ist.

Die orale Einnahme von Aktivkohle ist die am häufigsten genutzte Form der Magendekontamination, welche besonders gern bei potenziell vergifteten Kindern angewendet wird. Aktivkohle bindet unspezifisch die meisten organischen Moleküle durch hydrophobe Interaktion. Obwohl derzeit nicht als Behandlungsoption für die versehentliche Einnahme von Erdnüssen verwendet, könnte die Behandlung mit Aktivkohle potenziell die Allergenexposition im Magen reduzieren. Dies könnte dann ein sicheres und wirksames Verfahren sein, welches bewirkt, dass keine Allergene für das zusätzliche Auslösen einer allergischen, IgE-vermittelte Reaktion zur Verfügung stehen.

In einer Oral-Provokationsstudie [120], haben 25 % der teilnehmenden Erdnussallergiker mit einer Dosis von weniger als 100 mg Erdnüssen allergisch reagiert. Das ist eine beträchtlich geringere Dosis als bei den meisten anderen Allergenen, die häufig auftreten. Wenn diese relativ geringe Menge von Proteinallergenen auf Aktivkohle fest adsorbiert wird könnte sie problemlos den Magen-Darm-Trakt durchqueren, ohne eine allergische Reaktion hervorzurufen [92].

Durchführung:

- 1 mg/ml Lupinenproteinisolat in 20 mM Natriumphosphatpuffer geben (pH 7,5 mit 100 mM NaCl) für 30 min bei RT Rühren. Nach Zentrifugationschritt (15 min bei 4500 x g) den Überstand gewinnen. Der Überstand wird auch als Rohextrakt bezeichnet.

- Rohextrakt in getrennten Mikrozentrifugenröhrchen mit verschiedenen Konzentrationen von AC (5:1, 10:1, 20:1, 30:1, 40:1, 50:1, 60:1) bei 37 °C in einem Wasserbad für 2 min koinkubieren.
- Die Röhrchen auf einem Schüttler für 30 s durchmischen.
- Anschließend 15 min bei 4500 x g abzentrifugieren.
- Den Überstand auf das Vorhandensein von Proteinen mittels SDS-PAGE, Immunoblot und quantitative Protein Bestimmung analysieren.

3.7.5 Tanninbehandlung

Tannine gehören zu den so genannten quantitativen pflanzlichen Sekundärstoffen und enthalten ausreichend phenolische Ortho-di-Hydroxygruppen, um Quervernetzungen zwischen Makromolekülen wie Proteinen ausbilden zu können. Solche Vernetzungen können die Aktivität von Pflanzenenzymen und -organellen hemmen. Tannine bilden unlösliche Komplexe mit Eiweißen. Der Tanninbehandlung besteht in der Entfernung der Lupinen-Allergene als unlöslicher Tanninsäure-Komplex. Dafür wurden verschiedenen Konzentrationen an Tanninen genutzt.

Bisher wurden laut Literatur [29] nur Untersuchungen mit der Erdnuss durchgeführt, die positive Ergebnisse der Allergenitätsreduzierung zeigten.

Durchführung:

- 250 mg Lupinenmehlyophilisat in 50 ml Na₃PO₄ (50 mM pH 7,2) ü. N. bei RT resuspendieren.
- Anschließend Zentrifugationsschritt bei 5000 x g für 30 min.
- Vom Überstand (Überstand = Extrakt) Aliquote von 5 ml entnehmen und mit verschiedenen Mengen an Tanninsäure versehen (0,25 mg/ml; 0,50 mg/ml, 1,0 mg/ml und 2 mg/ml).
- Extrakte vortexen und erneut zentrifugieren (5000 x g für 30 min). Den Überstand dekantieren = 1. Überstand = S1. Das Pellet von der 1. Zentrifugation erneut mit PBS pH 2 resuspendieren und erneut zentrifugieren (5000 x g für 5 min).
- 2. Überstand = S2. Das Pellet vom 2. Überstand trennen und PBS (pH 8,0) zugeben, resuspendieren und bei 5000 x g für 5 min abzentrifugieren = 3. Überstand = S3.

Von allen Schritten wurde der Proteingehalt bestimmt, 1D SDS PAGE, Immunoblot und die EAST-Inhibition durchgeführt.

3.8 Proteinstabilitätsuntersuchung

Die Persistenz von Proteinen gegenüber proteolytischen Enzymen stellt einen wichtigen Parameter bei der Beurteilung der Bedeutung einzelner Allergene dar. Um die Übertragbarkeit von *In vitro*

Studien auf die menschliche Verdauung zu gewährleisten, ist eine Simulation unter möglichst realitätsnahen Bedingungen nötig. Es ist empfehlenswert, einen Verdau der mit Pepsin und Trypsin durchzuführen, da davon ausgegangen wird, dass eine Korrelation zwischen der Stabilität von Proteinen gegenüber dem Verdau und dem allergenen Potenzial besteht [4].

Die Stabilität von Proteinen gegenüber Enzymen bzw. die Vorgänge des Verdaus können *in vitro* und *in vivo* untersucht werden. In dieser Arbeit wurden keine *in vivo* Versuche durchgeführt.

- Für die *in vitro*-Untersuchung 40 mg Lupinenmehlisolat in 40 ml Puffer (1mM KCl, pH 1,5) resuspendieren.
- Für den Ansatz das Enzym Pepsin in einem Verhältnis 1:66 hinzugeben und in einem Wasser-Schüttelbad bei 37 °C inkubieren.
- Nach definierten Zeiten (1, 5, 15 und 30 min) Proben von jeweils 5 ml entnehmen.
- Zur Neutralisation (pH 7,0) in Probengefäße mit einer Vorlage von 0,2 M NaHCO₃ Lösung pipettieren und bis zur weiteren Bearbeitung auf Eis zwischenlagern.

Anschließend konnte der Überstand mittels einer 1D SDS PAGE, Immunoblot, sowie die EAST-Inhibition auf noch vorhandene Proteine oder immunogen wirkende Bruchstücke untersucht werden.

Für die Untersuchung der Stabilität des Lupinenmehls gegenüber dem proteolytischen Verdaus durch Trypsin wurde eine alkalische Extraktion des Lupinenmehlisolates mit 20 mM NaH₂PO₄ (pH 7,8) durchgeführt. Zu dem Ansatz (40 mg in 40 ml Puffer) wurde das Enzym Trypsin in einem Verhältnis 1:10 hinzugegeben. Der Ansatz wurde in einem Wasser-Schüttelbad bei 37 °C inkubiert und nach definierten Zeiten (1, 5, 15 und 30 min) Proben von jeweils 5 ml entnommen und sofort ohne weitere Behandlung tiefgefroren. Alle so gewonnenen Proben wurden dann später auf ihren Proteingehalt (BCA-Assay), Immunoblot (1D-SDS PAGE) und einer EAST-Inhibition geprüft.

3.9 *in silico*-Kreuzallergenitätsuntersuchung

Sequenzvergleich mit bekannten Allergenen

Zur Untersuchung von Sequenzhomologie stehen eine Reihe internetbasierter Programme zur Verfügung. Allen Programmen gemeinsam ist, dass die untersuchten Sequenzen im FASTA-Format in das Suchfenster eingegeben werden. Das FASTA-Format ist ein Text aus Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen, der im Einbuchstabencode (single letter code) geschrieben wird [214].

Das FASTA-Format geht aus dem Lipman und Pearson entwickelten FASTA Nukleinsäuren-bzw. Aminosäuresequenz-Abgleich-Programm hervor. Der FASTA Algorithmus wurde 1985 für Proteine entwickelt und 1988 auf Nukleotide erweitert [213]. Das FASTA-Alignement-Programm sucht nach

Ähnlichkeiten zwischen Sequenzen oder vergleicht gegebene Sequenzen mit Sequenz-Datenbanken.

Zur Untersuchung der Sequenzhomologien der Proteine zu bekannten Allergenen in Anlehnung an die FAO/WHO Richtlinie (2001), wurden die Datenbanken SDAP, EVALLER™, AllergenOnline herangezogen. Es wird geraten, Allergene zu identifizieren, die eine Homologie mit den Proteinen von 35 % in einem Fenster von 80 Aminosäuren bzw. eine Identität von 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren aufweisen [205].

SDAP [205]

SDAP (Structural Database of Allergenic Proteins) ist eine von der University of Texas Medical Branch (UTMB) betriebene Internetdatenbank. Außer der Nutzung von Sequenzen allergener Proteine stehen Computer-Werkzeugen zur Untersuchung der biologischen Struktur von Proteinen oder zur Untersuchung auf Kreuzreaktivität mit bekannten Allergenen zur Verfügung. Die SDAP-Datenbank beinhaltet Informationen zu Allergen-Namen, Quellen, Sequenzen, Strukturen, teilweise IgE-Epitopen, Literaturangaben und Links zu den größten Protein-(PIR, PDB, Swiss-Prot, NCBI) und Literaturservern (Pubmed, Medline) [205, 214].

EVALLER™ [206]

EVALLER™ ist eine Internetdatenbank, die anhand der Sequenzhomologien zu bekannten Allergenen eine bioinformatische Beurteilung von Proteinen auf ihre potenzielle Allergenität vom Typ I ermöglicht. Die in der EVALLER™ Datenbank hinterlegten Aminosäuresequenzen stammen aus öffentlich zugänglichen Katalogen allergener Proteine wie Allergome (www.allergome.org), der Allergenliste des IUIS (International Union of Immunological Societies) Allergen Nomenclature Subcommittee (WWW.allergen.org/List.htm), dem Food Allergy Research and Resource Program (Farrp) (<http://allergenonline.org/>), der Seite „The Allergen Database“ (<http://allergen.csl.gov.uk/>) und der Datenbank für Lebensmittelallergene pflanzlichen Ursprungs (<http://www.ifr.ac.uk/protall/>).

EVALLER™ (auch als EVALLER 2, bezogen auf den aktuellen Status der Revision angegeben) ist ein Web-Tool, wobei ein Protein elektronisch auf das Potential seiner Kreuzreaktivität mit bekannten Allergenen auf der Grundlage seiner Aminosäuresequenz getestet werden kann (e-Testing). Der Server ist abhängig von der Unterstützung durch toxikologischen/allergologischen Risikobewertern, Pflanzenzüchter, Hersteller von Biopharmazeutika und anderen Spezialisten mit einem Interesse an IgE-vermittelter Allergologie.

Der Server bietet als Ergebnis eine grafische und textuelle Interpretation der Ergebnisse um weitere Abfragen bezüglich des allergenen Potenzials eines Proteins zu erleichtern.

AllergenOnline [208]

AllergenOnline ist ein Programm der Universität von Nebraska und wird durch Food Allergy Research and Resource Program (Farrp) des Departments of Food Science and Technology betrieben [208].

Farrp wurde 1995 als Kooperationsprojekt zwischen der Universität von Nebraska und 7 Industriepartnern gegründet. Das Programm beruht auf einer weltweiten Zusammenarbeit mit Forschungsinstitutionen, Behörden, Verbrauchergruppen und Wissenschaftlern, um die Sicherheit von Lebensmittelprodukten für Verbraucher mit Lebensmittelallergien zu verbessern [208, 214].

3.10 Enzymallergosorbent-Test (EAST)

Der EAST ist eine enzymimmunologische Methode zur Bestimmung des Gehaltes an freien, spezifischen Antikörpern der Immunglobulinklasse E im Blutserum [152]. Dieser Test ist eine der wichtigsten *In vitro* Untersuchungsmethoden zur Diagnose von Lebensmittelallergien [152].

Das Test-Prinzip erfolgt durch einen nichtkompetitiven Enzymimmunoassay. Die Festphase besteht aus einer chemisch aktivierten Papierscheibe, an die die entsprechenden Allergene kovalent gebunden sind. Im ersten Schritt wird Patientenserum bzw. -Plasma auf die Allergenscheibe pipettiert. Dabei erfolgt eine Bindung des allergenspezifischen IgE an das festphasengebundene Allergen. Im 2. Schritt wird ein enzymmarkiertes Anti-human-IgE auf die Allergenscheibe mit dem Allergen-IgE-Komplex gegeben. Dabei erfolgt eine Bindung des markierten Anti-human-IgE an das festphasengebundene spezifische IgE. Die Menge des gebunden, markierten Anti-human-IgE ist proportional zur Menge des spez. IgE im Serum/Plasma. Anschließend wird eine Substratlösung (p-Nitrophenylphosphat) hinzugegeben. Durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase entsteht eine gelb gefärbte Lösung. Die Enzymreaktion wird am Ende der Inkubationszeit mit einer Stopplösung beendet. Die Extinktionen der gefärbten Lösungen werden am Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm (3)/(4) gemessen. Die Auswertung erfolgt über eine Standardkurve, bestehend aus den Extinktionswerten der gemessenen Referenz-Kavitäten [221].

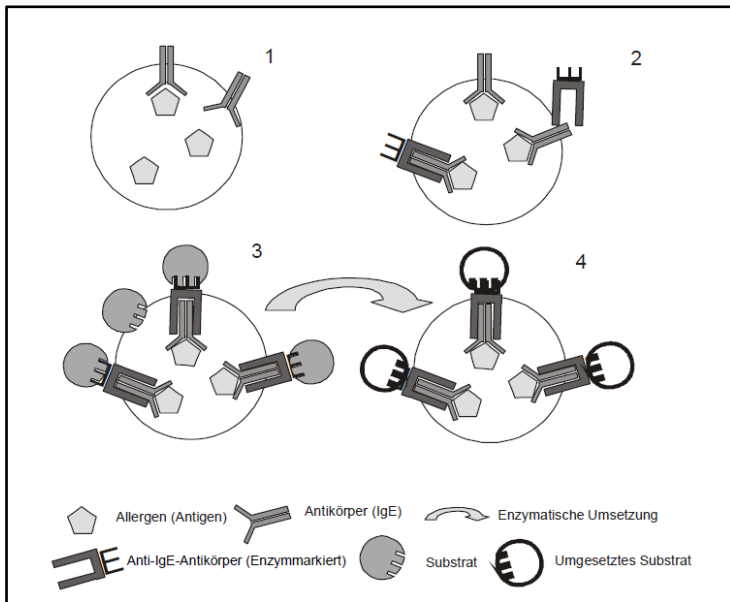


Abb. 8: Prinzip des Enzymallergosorbent-Testes (EAST) [152].

Die Einteilung der Patientenseren nach ihrem IgE-Gehalt erfolgt über Referenzseren gegen Lieschgras mit bekanntem IgE-Gehalt unter Verwendung der entsprechenden Lieschgras-Allergenscheiben in eine der in Tab. 6 dargestellten EAST-Klassen. Die Ergebnisse werden in UE/ml angegeben. 1 UE = 2,4 ng IgE [221].

Tab. 6: Einteilung der EAST-Klassen [221].

IgE-Gehalt [U/ml]	EAST-Klasse
<0,35	0
$\geq 0,35 < 0,7$	1
$\geq 0,7 < 3,5$	2
$\geq 3,5 < 17,5$	3
$\geq 17,5 < 50$	4
≥ 50	5

3.11 EAST Inhibition

Die EAST-Inhibition stellt einen kompetitiven Hemmtest dar, der eine relative Quantifizierung des allergenen Potenzials der eingesetzten Proteinextrakte ermöglicht. Vor der eigentlichen Messung erfolgt eine Inkubation des Patientenserums mit dem auf seine allergene Potenz zu untersuchenden Extrakt (Inhibitorlösung) statt [123, 152, 184]. Die sich frei in Lösung befindlichen und festphasengebundenen Allergene treten in eine Konkurrenzreaktion mit den aus dem Patientenserum stammenden, spezifischen IgE. Je größer das Inhibitionsvermögen des jeweils

eingesetzten Extraktes ist, desto stärker wird das Messsignal vermindert. Es wurden verschiedene Verdünnungen der Lösung angesetzt, um eine Bestimmung der Konzentration des jeweiligen Proteinextraktes, an der es zu einer 50 %igen Verminderung des Messsignales (C_{50} -Wert) kommt, zu ermöglichen. Anhand der C_{50} -Werte ist ein Vergleich der allergenen Potenz von verschiedenen Extrakten untereinander möglich [152]. Die homologe Inhibition wird definiert durch den C_{50} -Wert der Inhibition mit dem nativen Extrakt und dieser kann zu einer maximalen Verminderung des Messsignals führen. Die Kalkulation erfolgt aus der Abhängigkeit der prozentualen Inhibition von der logarithmischen Proteinkonzentration der Inhibitorextrakte in Form einer logarithmischen Regression [152]. Als Inhibitorlösungen dienten Extrakte der modifizierten Proteine sowie Proteinfasern und Proteinflocken. Die Enzymallergosorbent-Test (EAST) Durchführung kann aus den Anhang (Anhang 8.2) entnommen werden.

3.12 Ausschluss des zytotoxischen Potenzials an normalen humanen Leberzellen (Hepatozyten)

Die Leber stellt das stoffwechselaktivste Organ des menschlichen Organismus dar. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Lupinenproteinisolate und deren Fraktionen (Lupinenfasern und Lupinenflocken) zytotoxisch auf Hepatozyten wirken. Bei den verwendeten Hepatozyten handelt es sich um, humane Primär-Zellen ohne Pathologien. Diese Zellen wurden von der Firma Primacyt (Schwerin, Deutschland) frisch isoliert und ausplattiert. Der genutzte Bioassay gilt als eine sehr effektive, zeitgemäße Methode zur Untersuchung der Zytotoxizität einer Substanz auf Zellen. Der Zytotoxizitätsassay wurde im Mikrotiterplatten-Format angesetzt, was eine sehr schnelle und simultane Analyse der Testansätze ermöglichte, sowie nur einen geringen Verbrauch an Zellen, Zellkulturmedien, Testsubstanzen und anderen Verbrauchsmaterialien verursachte. Zudem konnten die einzelnen Versuchsansätze auf der 96-Well-Platte mit einem hohen Grad an Präzision direkt am ELISA-Reader gemessen werden.

Für den Test konnte das Lupinenmehl sowie die Lupinenfasern und Lupinenflocken in vier unterschiedlichen Proteinkonzentrationen verwendet werden. Für die Hepatozyten wurde der LDH-Test durchgeführt.

Tab. 7: Verwendete Protein-Fraktionen und Konzentrationen für den LDH-Test

Proteinfraktion	Proteinkonzentration [µg/ml]
Fasern unverdünnt	3102
Fasern 1:2	1551
Faser 1:50	62,04

Fasern 1:100	31,02
Flocken unverdünnt	8046
Flocken 1:2	4023
Flocken 1:50	160,92
Flocken 1:100	80,46
Isolat unverdünnt	9553
Isolat 1:2	4776,5
Isolat 1:50	191,06
Isolat 1:100	95,53

3.12.1 LDH-Zytotoxizitätstest

Der LDH-Test gibt Aufschluss über die Zytotoxizität einer Substanz auf Zellen. Es ist ein kolorimetrisches, nicht radioaktives Verfahren zur Quantifizierung des Zelltodes und der Zellyse, basierend auf der Messung des zytotoxischen Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH), welches von lysierten Zellen in den Zellkulturüberstand abgegeben wird. Die Messung der freigesetzten LDH resultiert dann in der Umsetzung von gelbem Tetrazoliumsalz zu rotem Formazan. Diese Farbänderung ist proportional der Anzahl geschädigter und toter Zellen und wurde quantitativ am ELISA-Reader bei $\lambda = 490 \text{ nm}$ ermittelt.

Das Enzym LDH kommt in fast allen Körperzellen vor und erreicht besonders hohe Konzentrationen in metabolisch aktiven Zellen und Geweben, wie z.B. Herz, Muskeln und Leber. Es liegt nach Zellyse im Medium stabil vor, da es gegen den Abbau durch Proteasen resistent ist. Die LDH-Aktivität basiert auf einem enzymatischen Test: Zuerst wird Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD)⁺ zu NADH/H⁺ durch die gleichzeitige LDH-katalysierte Reaktion von Lactat zu Pyruvat reduziert. Dann wird der Katalysator Diaphorase und das Tetrazoliumsalz 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT) hinzugegeben. Die Diaphorase katalysiert die Reduktion von gelbem Tetrazolium INT zu rotem Formazansalz (Abb. 9). Diese Farbänderung wird mittels eines ELISA-Photometers gemessen. Dabei entspricht die Farbtintensität der Quantität an gebildetem Formazan. Daraus lässt sich auf die Menge an LDH im Überstand schließen, welche mit der Anzahl toter Zellen korreliert [210].

Für die Berechnung der Zytotoxizität der Substanzen auf die Zellen wurde folgende Gleichung verwendet.

Relative Zytotoxizität [%]

$$= 100 * \frac{\text{Extinktion (Probe)} - \text{Extinktion (Negativkontrolle 2)}}{\text{Extinktion (High Control)} - \text{Extinktion (Negativkontrolle 2)}}$$

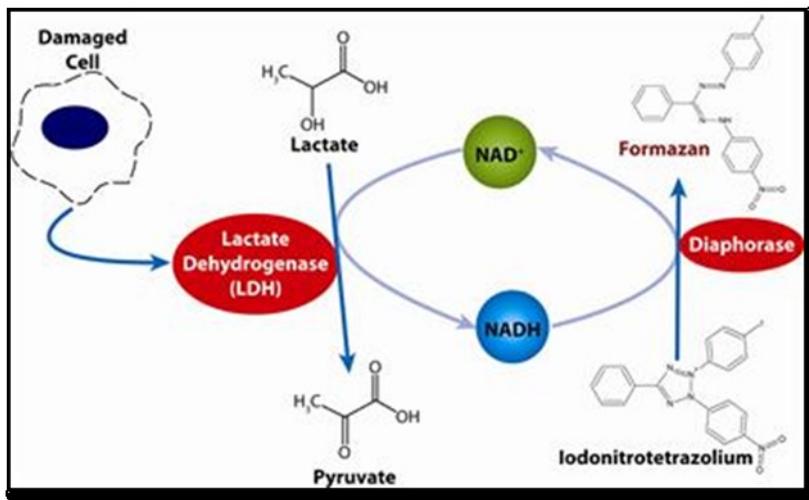


Abb. 9: Prinzip des LDH Zytotoxizitätstest: Entwicklung von gelben Tetrazoliumsalz zur roten Formazansalz [210].

Schritte:

1. Zellkultivierung: 100 μl /Well Zellsuspension in 96-Well-Platte,
24 h Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5,0 % CO_2 und wasserdampfgesättigte Atmosphäre)
2. Mediumwechsel: Entfernung des verbrauchten HHMM: Human Hepatocyte Maintenance Medium (10 % FKS)
Zugabe von 198 μl /Well frisches HHMM (1 % FKS)
3. Zugabe von 2 μl /Well Proteinisolat bzw. Kontrollen
24 h Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO_2 und wasserdampfgesättigte Atmosphäre)
4. Pipettieren von 100 μl Überstand in eine neue 96-Well-Platte
5. Zugabe von 100 μl /Well Reaction mixture auf die 100 μl Überstand der neuen Platte, 10 bis 30 min Inkubation im Dunkeln bei RT
6. Zugabe von 50 μl /Well 1N HCl zum Abstoppen der Reaktion
7. Messung am ELISA-Reader ($\lambda = 492 \text{ nm}$, Referenz $\lambda = 620 \text{ nm}$)

Durchführung:

- Nach 24 h Zellinkubation das verbrauchte Zellkulturmedium (mit 10 % FKS) durch 198 μl frisches HHMM (mit 1 % FKS) ersetzen.
- Die Proteinisolate und die Positiv- und Negativkontrollen hinzugeben.
- Bei diesem Test gibt es eine zusätzliche Kontrolle, die High control, diese gibt die maximal mögliche LDH-Aktivität der Zellen an, da alle Zellen durch das Detergenz Triton X-100 zerstört werden.

- Die High Control besteht aus 198 µl Medium + Zellen und 2 µl 1 % Triton.
- Die Substanzen erneut 24 h unter physiologischen Bedingungen: 37 °C, 5,0 % CO₂ und wasserdampfgesättigte Atmosphäre inkubieren.
- Anschließend die LDH-Aktivität und dem daraus resultierenden Farbänderung spektrophotometrisch am ELISA-Reader messen.

3.12.2 Metabolische Untersuchungen

Die quantitative Analyse von Harnstoff, der im Harnstoffzyklus der Zelle entsteht und die Bestimmung von Albumin sind wichtige Funktionsparameter für Leberzellen.

Die Bestimmung des Harnstoffs sowie Albumin wurde in der Abteilung für Labordiagnostik Klinikum Südstadt Rostock in Auftrag gegeben. Sowohl der Harnstoff- als auch die Albumin - Konzentrationen wurden nach 24, 48 und 72-stündiger Einwirkung der Eiweißisolate auf die Hepatozyten von der Firma Primacyt (Schwerin, Deutschland) ermittelt. Geplant waren weiterhin metabolische Untersuchungen an mehreren Patientenproben. Allerdings konnten aufgrund Materialmangels diese Untersuchungen nur an Probenmaterial eines Patienten durchgeführt werden. Eine valide Aussage anhand dieser einen Probe ist nicht möglich, deshalb wurde das Ergebnis der einen Probe in den Anhang verschoben.

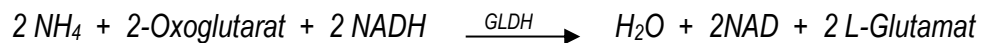
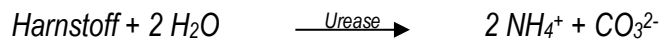
Harnstoff

Die Harnstoffbestimmung ist der am weiteste verbreitete Test der Nierenfunktion. Harnstoff ist eine organische Verbindung, die als ein Endprodukt des Proteinmetabolismus im Harnstoffzyklus synthetisiert und mit dem Urin über die Nieren ausgeschieden wird. Die Harnstoffbildung aus Kohlendioxid und Ammoniak dient der Elimination des toxischen Ammoniaks, welches beim Eiweißstoffwechsel entsteht. Das Ausmaß der Harnstoffsynthese ist abhängig von der Proteinzufuhr mit der Nahrung und dem endogenen Proteinkatabolismus. Hohe Harnstoffkonzentrationen deuten demzufolge sowohl auf eine hohe Proteinzufuhr als auch einen hohen Proteinabbau in den Leberzellen hin. Ist die Harnstoff-Konzentration jedoch zu gering, spricht das *in vivo* für eine Leberinsuffizienz [211].

Zur Analyse wird Reagenz der Firma Beckman Coulter benötigt. Diese Reagenzien sind gebrauchtsfertig und nach Anbruch 30 Tage stabil.

Prinzip der Untersuchung (kinetischer UV-Test):

Harnstoff wird durch Urease zu Ammoniak und CO₂ hydrolysiert. Der Ammoniak reagiert mit 2-Oxoglutarat und NADH in Gegenwart von Glutamat-Dehydrogenase zu Glutamat und NAD



Es besteht eine Proportionalität des Maßes der Absorptionsabnahme durch die Verringerung der NADH-Konzentration zur Harnstoffkonzentration. Die Probeidentifizierung, sowie die Übertragung der Ergebnisse erfolgt automatisch durch das Messgerät [212].

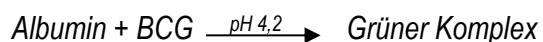
Albumin

Albumin ist ein globuläres Protein, welches im Blut vorkommt und verschiedene Funktionen im Körper ausübt. Eine Aufgabe stellt die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes dar, der die Flüssigkeitsverteilung innerhalb und außerhalb der Körperzellen bestimmt. Albumin ist ein wichtiges Transportprotein im Blut. Ohne Albumin könnten hydrophobe Substanzen wie Fettsäuren, Vitamine, Hormone, Spurenelemente, Medikamente, Bilirubin, Kationen und viele weitere Stoffe nicht transportiert werden. Zu geringe Albumin-Werte kommen unter anderem bei Leberfunktionsstörungen vor. Eine beeinträchtigte Synthese erfolgt aufgrund einer Lebererkrankung oder Infolge einer verminderten Proteinaufnahme, Geweschädigung oder Entzündung. Die Albuminbestimmung stellt einen Leberfunktionstest dar [211, 213].

Zur Analyse wird Reagenz der Firma Beckman Coulter benötigt. Diese Reagenzien sind gebrauchtsfertig, geöffnet im Gerät 90 Tage stabil.

Prinzip der Untersuchung (Photometrische Farbttest):

Durch Reaktion von Bromkresolgrün (BCG) mit Albumin entsteht ein farbiger Komplex. Die Absorption des Albumin-Bromkresolgrün-Komplexes wird biochromatisch gemessen und ist proportional zur Albuminkonzentration in der Probe.



Die Probeidentifizierung, sowie die Übertragung der Ergebnisse erfolgt automatisch durch das Messgerät [212].

3.13 Statistik

Die statistische Auswertung des Proteingehalts des Lupinenmehlisolats und die Proteinmodifikationen erfolgten mittels Varianzanalyse (ANOVA Verfahren von englisch analysis of variance), in diesem Fall einfaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Test Bonferroni. Software: SPSS Version 22. Signifikante Ergebnisse wurden in den Diagrammen wie folgt gekennzeichnet: * $p \leq 0,05$ Sterne auf den Säulen beziehen sich auf den Vergleich mit den schwarzen Säulen (Kontrolle).

4 Ergebnisse

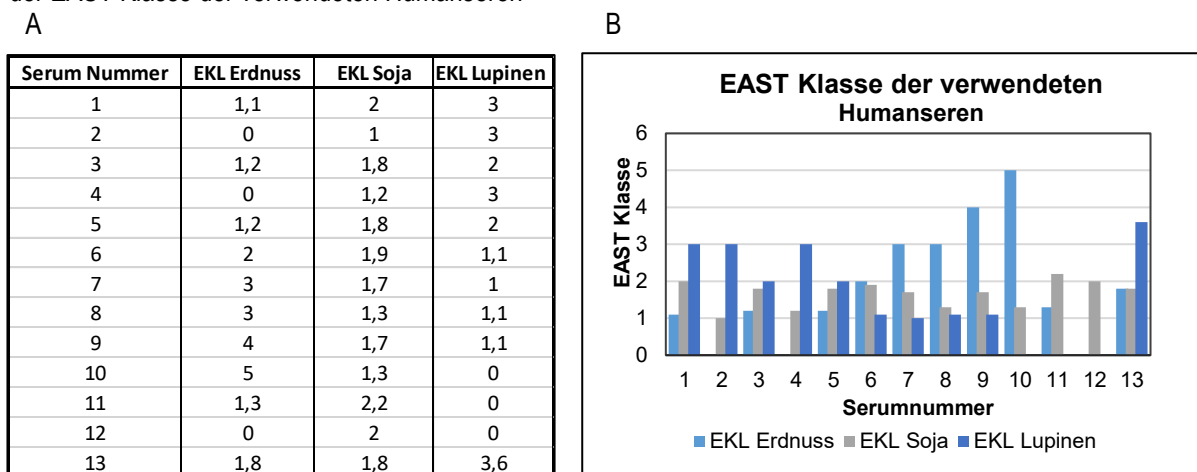
Zuerst werden die Ergebnisse der Charakterisierung zur Detektion von Allergenen verwendeten Humansen von Erdnuss-, Soja- und Lupinenallergikern vorgestellt. Es folgt die Charakterisierung und Identifizierung der Allergene bzw. Proteine des Proteinisolates aus dem *Lupinus angustifolius*. Im dritten Abschnitt werden die Ergebnisse der durchgeführten Modifikationen zum Anstreben einer Reduktion der Allergenität sowie die *in vitro*- und *in silico*-Kreuzallergenitätsuntersuchungen dargestellt. Außerdem ist die Analyse der Zytotoxizitäts-untersuchung des Lupineneiweißes an normalen humanen Hepatozyten durchgeführt worden, um die Unbedenklichkeit der Lupine als Lebensmittel zu untermauern.

4.1 Charakterisierung der Patientenseren

4.1.1 Charakterisierung mittels EAST

Die Ergebnisse der EAST-Untersuchungen sind in der Tab. 8 dargestellt. Diese Tabelle enthält 13 der untersuchten Seren, die einen IgE-Gehalt von $\geq 0,35$ U/ml gegen Erdnüsse, Soja bzw. Lupinen aufweisen und somit in die EAST-Klassen 1 bis 5 eingeteilt werden.

Tab. 8: A) EAST-Klassen der verwendeten Patientenseren. EKL: EAST-Klasse. B) Graphische Darstellung der EAST Klasse der verwendeten Humansen



Es konnte beobachtet werden, dass bei Serum 12 spezifische Antikörper nur gegen eine Hülsenfrucht (Soja) vorliegen. Die Seren 2, 4, 10 und 11 besitzen spezifische Antikörper gegen 2 Hülsenfrüchte und ansonsten liegen spezifische Antikörper gegen alle 3 untersuchten Hülsenfrüchte vor.

4.1.2 Charakterisierung mittels Immunoblot

Zur weiteren Charakterisierung wurde das Lupinenmehlisolat (Proteingehalt: 95,3 µg/ml) elektrophoretisch mittels SDS-PAGE getrennt. Dafür wurde ein 12 %iges Bis-Tris-Elektrophoresegel verwendet.

Nach anschließendem Transfer der getrennten Proteine auf eine NC-Membran wurde diese unter Verwendung eines der 13 Einzelseren mit einer zuvor bestimmten EAST-Klasse ≥ 2 immungefärbt. Zur Identifikation unspezifischer Bindungen erfolgte zudem eine Inkubation eines NC-Streifens mit dem Serum eines Nicht-Allergikers (EAST Klasse = 0) als Negativkontrolle. In der Abb. 10 sind die mit den jeweiligen Einzelseren immungefärbten NC-Streifen dargestellt. Der mit „Pool“ gekennzeichnete NC-Streifen wies als Positivkontrolle spezifische Färbungen auf. Tab. 6 gibt Aufschluss über das Vorkommen und die Intensität der Antikörper der Einzelseren im Immunoblot. Die Abb. 10 zeigt den in dieser Arbeit verwendeten Proteinmarker Precision Plus Protein Dual Xtra der Firma BioRad, mit dessen Hilfe die Massen den jeweiligen Proteinbanden zugeordnet wurden. Bei allen 13 getesteten Seren konnte mindestens eine Allergenbande detektiert werden. Die meisten Seren wiesen spezifische IgE-Antikörper gegen Allergene im Molekulargewicht (MG)-Bereich von Conglutin β (ca. 80 kDa) und Conglutin α (25 - 50 kDa) auf. Im Bereich von Conglutin δ (93 kDa) zeigte sich nur bei dem Serum Nr. 6 eine spezifische Bandenfärbung.

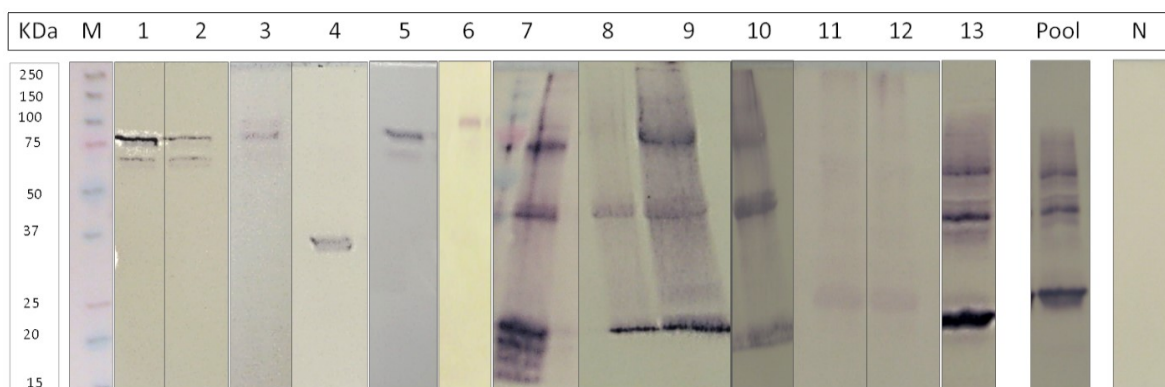


Abb. 10: Immunoblot von Lupinenmehlisolat unter Verwendung der Einzelseren. M: Marker, 1-13: Testseren, N: Negativkontrolle, Pool: benutztes Poolserum für die Untersuchungen.

Weitere Allergenbanden konnten mit den Einzelseren im Bereich von 150, 80, 50, 40 20 und 15 kDa detektiert werden. Der Serumpool weist Banden von 100 bis 30 kDa auf. Unspezifische Bindungen konnten durch die Inkubation mit dem Serum eines Nicht-Allergikers (N = Negativkontrolle) ausgeschlossen werden.

Tab. 9: Zusammensetzung des Poolserums

Serum-Nr.	ml im Pool
1	5
2	5
3	5
4	5
5	5
6	5
7	5
8	5
9	5
10	5
11	3
12	3
13	5
Gesamt	61

Mit Hilfe des Poolserums und Biochemischer Assays konnten alle relevanten Allergene identifiziert und in ausreichender Intensität detektiert werden.

4.2 Proteingehalte der verwendeten Lupinenfraktionen und dessen Allergenes Potenzial

Die Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Methode nach BCA ermittelt. Die genauen Messwerte und Berechnungen der Proteingehalte sind im Anhang dargestellt.

Abb. 11 zeigt die mit der Methode nach BCA ermittelten relativen Proteingehalte der Proteinfractionen in [%]. Wie zu erwarten, zeigt das Lupinenmehlisolat einen hohen Proteingehalt bis zu 93 %, die Lupinenfasern einen Proteingehalt von 37 % und die Lupinenflocken einen Proteingehalt von 22 %. Lupinenfasern und Lupinenflocken wichen von einander signifikant zur Kontrolle (unbehandeltes Lupinenmehlisolat) ab. Für die Messwerte der jeweiligen Vierfachbestimmungen ergaben sich keine Ausreißer.

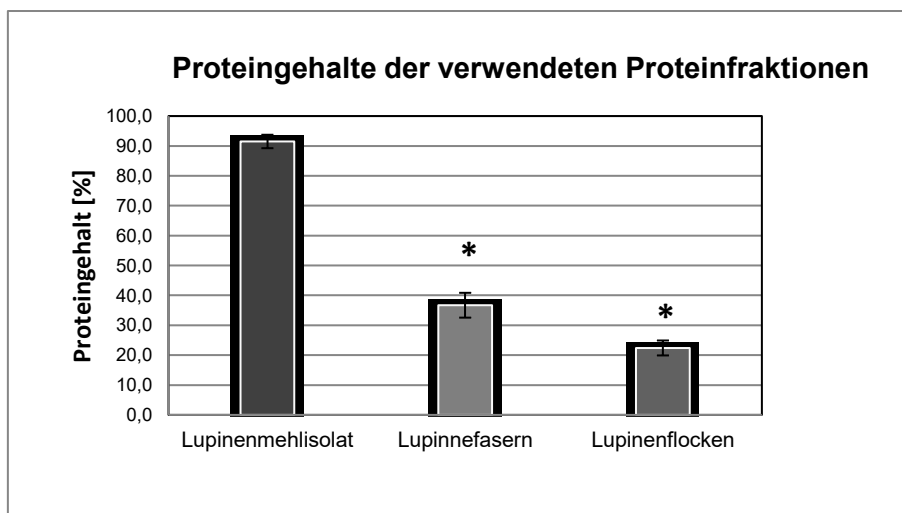


Abb. 11: Proteingehalt in [%] der verwendeten Proteinfractionen. Bestimmung nach BCA. Statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels ANOVA einfaktorielles Varianzanalyse mit Post-hoc-Test Bonferroni. * (signifikant): $p \leq 0,05$; Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardabweichung von ($n = 4$).

Wie bereits erwähnt, ist es mit der EAST-Inhibition möglich, eine relative Quantifizierung des allergenen Potenzials nachzuweisen. Hier konnten die einzelnen Proben in Form von Lupinenfasern, Lupinenflocken und Lupinenmehlisolaten quantifiziert werden. Das für diesen Test eingesetzte Poolserum (EAST Klasse 3,6) ist in einem Verhältnis von 1:2 mit Kalium-phosphatpuffer verdünnt worden. Von den drei Extrakten wurden jeweils Verdünnungsreihen (in 11 Stufen; beginnend mit 1:3) zur Testdurchführung erstellt. Die Messungen erfolgten in Doppelbestimmung. Zur Beurteilung der allergenen Potenz eines Extraktes ist es notwendig, dass der 50 % Hemmwert überschritten wird, was bei allen drei Extrakten gegeben war.

Die dargestellten Kurvenverläufe bestätigen ein allergenes Potenzial bei Lupinenfasern, -flocken und -mehl von 75 % bis 90 % (Abb. 12).

Das allergene Potenzial der Lupinenproteine ist mit der Methode EAST-Inhibition bestimmt worden. Die drei Lupinenfraktionen: Lupinenmehlisolat, Lupinenfaser und Lupinenflocken zeigten sich als Allergene mit einer Inhibition von bis zu 90 %.

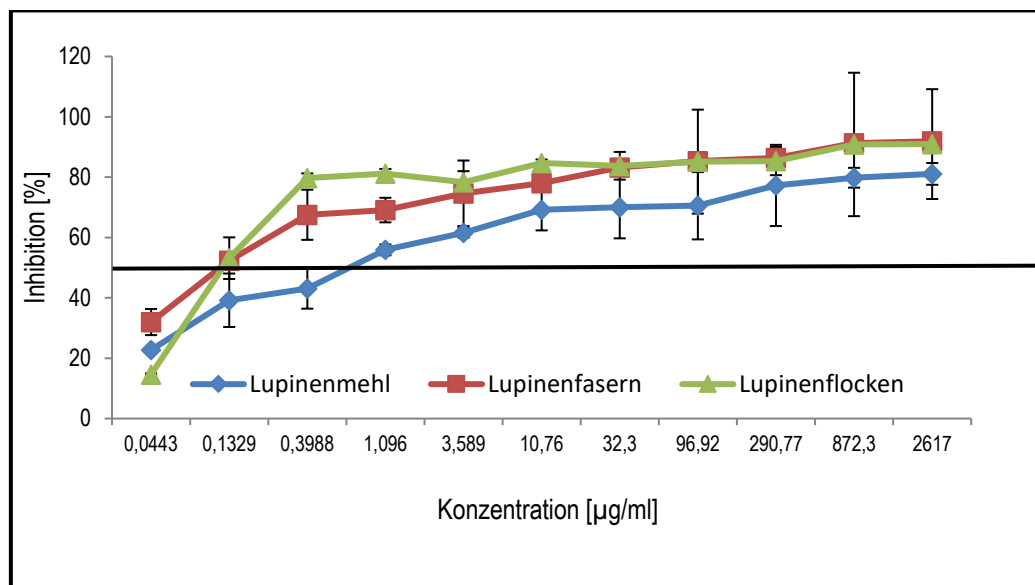


Abb. 12: Allergenes Potenzial der verwendeten Lupinenfraktionen (Mehl, Fasern und Flocken) mittels EAST-Inhibition. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.3 Proteincharakterisierung 1D SDS PAGE und 2D SDS PAGE

Es wurden 2 verschiedene Gelelektrophoresen (1D SDS-PAGE, und 2D SDS-PAGE) durchgeführt, um unter unterschiedlich Bedingungen die vorhandenen Komplexe zu analysieren. Die gefundenen Proteine sollten im Immunoblot auf IgE-Reaktivität mit Patientenseren getestet und identifiziert werden.

4.3.1 Eindimensional SDS-PAGE

Diese Untersuchung wurde am Proteomzentrum der Universität Rostock mit Herrn Dr. Mikkat durchgeführt.

Die Lupinenproteine wurden zuerst mittels 1D SDS PAGE aufgetrennt. Aufgetragen wurden 15 µg Protein pro cm Probentasche. Eine Auswahl von mittels SDS-PAGE getrenntem und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Proteinextrakten der Lupinenproteinisolate zeigt Abb. 13.

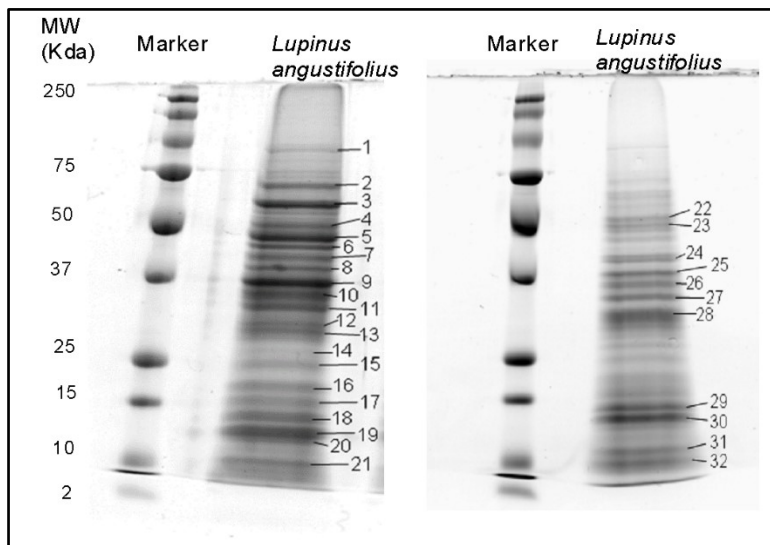


Abb. 13: 1D SDS PAGE des Lupinenmehlisolates, 12 % red. SDS-PAGE, Probenkonz. 15 µg/cm, Coomassie-Färbung.

Die Bandenmuster der mittels SDS-PAGE getrennten Lupinenmehlisolate zeigen bis zu 32 verschiedene Proteinbanden, die aber deutliche Intensitätsunterschiede im MG-Bereich von etwa 9 kDa bis ca. 80 kDa aufweisen. Besonders intensive Banden sind in den Bereichen von ca. 60 kDa, 20 - 25 kDa, 30 - 35 kDa sowie 10 kDa zu erkennen. Um die eindeutige Zuordnung der einzelnen Banden zu ermöglichen, wurden MS/MS Messungen durchgeführt sowie die IgE Reaktivität im Immunoblot mit einem Patientenpoolserum (EAST Klasse 3,6) untersucht.

4.3.2 Proteinidentifizierung der Lupinenmehlisolate aus der 1D SDS PAGE

Die aufgetrennten Banden der 1D SDS PAGE wurden ausgeschnitten und in Gegenwart von DTT mit Trypsin verdaut. Die Tab.10 zeigt die Ergebnisse der einzelnen Banden. Die Messungen wurden mit 4700 Analyzer Mascot-Search gegen SWALL 2011_09 *Viridinplantae*, 50 ppm, durchgeführt.

In den Bereichen von 75, 71, 70 und 61 kDa konnte die Conglutinfamilie B und dessen Isoformen (β 1 - 6) identifiziert werden. Die Conglutinfamilie α und dessen Isoformen (α 1 - 3) wurden in den Bereichen von 74, 67 und 57 kDa identifiziert. Von Conglutin δ 2 konnte nur die schwere Kette gefunden werden. Conglutin γ war mit dieser Methode nicht identifizierbar. Anschließend erfolgte eine 2D SDS PAGE, um diese Ergebnisse bestätigen zu können.

Die Ergebnisse der Tab. 10 sind in der Abb. 14 und 15 als Kreisdiagramm dargestellt. In der untersuchten Pflanze waren außer Conglutinen keine weiteren Proteine nachweisbar. Es ist deutlich zu erkennen, dass das Conglutin β und dessen Isoformen die Mehrheit der ganzen Lupinenproteine darstellt (63 %) gefolgt von Conglutin α (31 %) und Conglutin δ (6 %).

Die Abb. 15 zeigt deutlich, dass Conglutin α 2 67 % der Proteine im Gel der 1D SDS PAGE ausmacht, gefolgt von α 1 mit 27 %. Von den Isoformen des α 3 sind nur 3 % enthalten. Von der Conglutinfamilie β ist β 5 mit 47 % am stärksten im Gel vertreten, gefolgt vom β 1 mit 37 %, und β 2 mit 7 %. β 3,4,6 konnten nur mit 3 % im Gel identifiziert werden.

Tab. 10: Proteinbanden des Lupinenmehlisolates mittels 1D SDS PAGE

Band	Molekular Gewicht (Da)	Proteinname (Conglutin)	Band	Molekular Gewicht (Da)	Proteinname (Conglutin)
1	75163	β 5	17	57758	α 1
2	75613	β 5	17	75163	β 5
3	74150	α 2	18	54267	β
4	75163	β 5	19	74150	α 2
4	61433	β Fragment	19	71853	β
5	67340	α 3	20	71853	β
5	74150	α 2	21	9394	δ -2 large chain
6	74150	α 2	22	75163	β 5
7	74150	α 2	22	70658	β 2
7	71853	β	23	75163	β 5
8	71853	β	23	69366	β 4
8	74150	α 2	24	71853	β
9	75163	β 5	24	74150	α 2
9	57758	α 1	25	57758	α 1
10	75163	β 5	26	75163	β 5
10	74150	α 2	26	74150	α 2
11	71853	β	27	71853	β
12	75163	β 5	28	68139	β 3
13	75163	β 5	28	75163	β 5
14	75163	β 5	29	70658	β 2
15	74150	α 2	29	54267	β
15	61433	β Fragment	30	61994	β Fragment
16	75163	β 5	30	70082	β 6
16	57758	α 1	31	9394	δ -2 large chain
			32	9394	δ -2 large chain

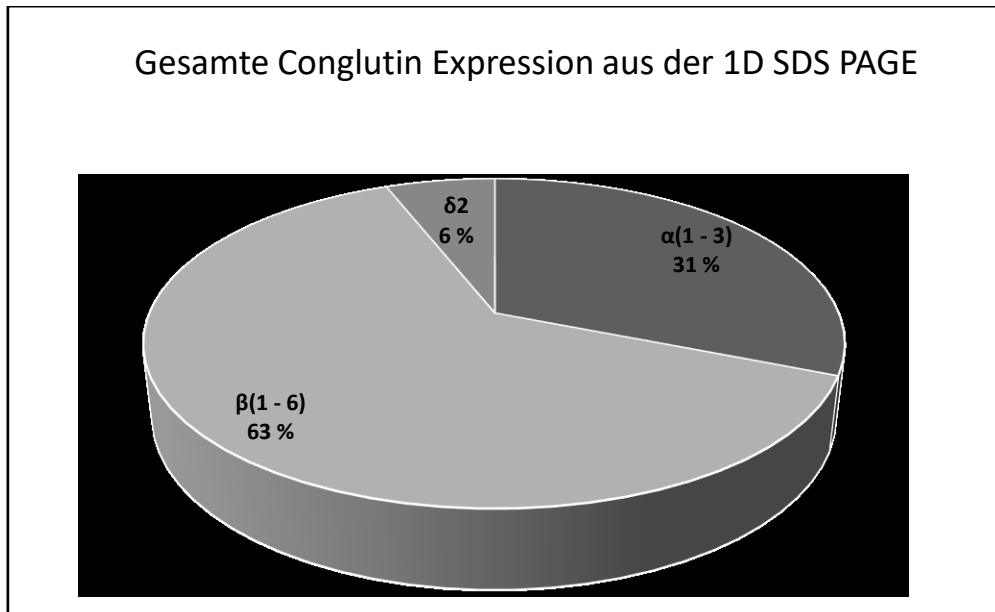


Abb. 14: Conglutin Expression der *Lupinus angustifolius*, mittels 1D SDS PAGE.

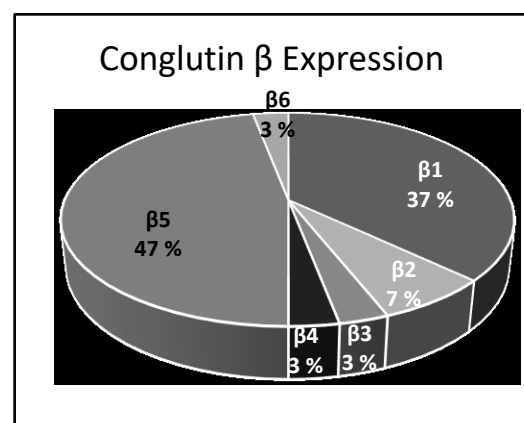
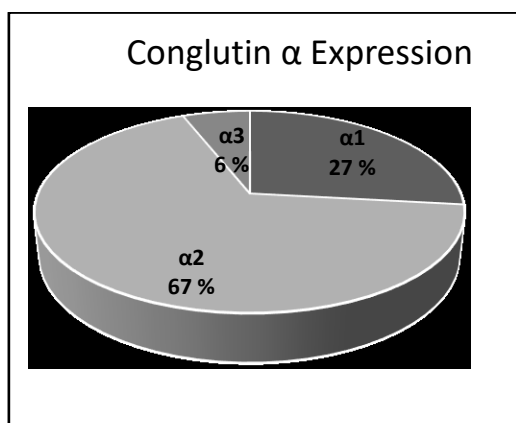


Abb. 15: Conglutin α und β Expression der *Lupinus angustifolius* bestimmt mittels 1D SDS PAGE.

4.3.3 Immunoblot

Die Ergebnisse des Immunoblots der Lupinenproteinextrakte sind in Abb. 16 dargestellt. Die Blotstreifen wurden mit dem Serumpool sowie dem Serum einer nichtsensibilisierten Person als Negativkontrolle inkubiert. Eine Charakterisierung der Allergenbanden hinsichtlich ihres MG erfolgte wiederum anhand eines MG-Markers.

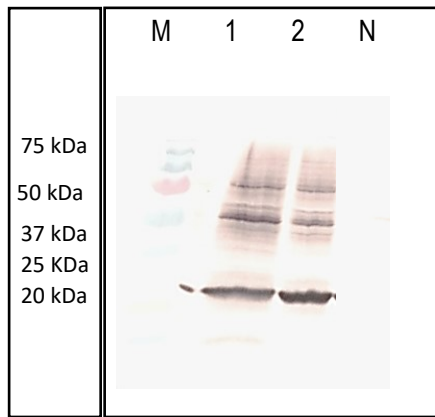


Abb. 16. Immunoblot zur Identifizierung der Lupinenallergene. mit Serumpool. 12 % SDS-PAGE. M: Marker, 1: Lupinenmehlisolat, 2: Wiederholung des Lupinenmehlisolats, N: Negativkontrolle.

Wie die Abb. 16 zeigt, sind Banden zwischen 75 und 20 kDa erkennbar. Die Banden zwischen 50 und 75 kDa und die Bande bei 20 kDa im Lupinenmehl sind IgE-reaktiv. Besonders intensiv sind die Banden bei 50 und 30 kDa, während die Banden zwischen 50 und 75 kDa schwächer sind. Zusätzlich wurden Banden oberhalb von 75 kDa detektiert. Um eine Zuordnung der Allergene zu erhalten, wurden monoklonale Anti-humane IgE alkaline Phosphatase Mausantikörper eingesetzt. Zusätzlich ergab sich eine Bande bei ca. 30 kDa. Im Immunoblot wurden vier Banden bei 30-50 kDa detektiert, sowie eine Doppelbande bei 50 kDa. Die nachgewiesenen Proteinkonzentrationen spielten auch bei der Antikörperbindung eine wichtige Rolle. Insgesamt ließen sich in den Lupinenmehlisolaten mehr als 20 Proteinbanden nachweisen, die fast alle IgE-Reaktivität zeigten und über ihre Molekulargewichte und das Bindungsverhalten mit mono- und polyklonalen Antikörpern identifiziert werden konnten. Die Banden gehörten zu Conglutin α , Conglutin β und dessen Isoformen.

4.3.3 Zweidimensionale SDS PAGE

Diese Untersuchung wurde am Proteomzentrum der Universität Rostock mit Hilfe von Herrn Dr. Mikkat durchgeführt.

Die Ergebnisse der 1D SDS PAGE sollten nun mit zweidimensionalen Elektrophoresen bestätigt werden. Laut Literatur [52] besteht die Proteinfamilie der Blauen Süßlupine aus 4 Conglutin-Familien: Conglutin α , β , γ und δ . In der 1D SDS PAGE konnten allerdings nur die Conglutine α , β und δ identifiziert werden.

Mit der 2D SDS PAGE (Abb. 17) sind 61 Spots identifiziert worden. Bei dieser zweidimensionalen Auftrennung deutete sich an, dass die Proteine nach Trennung auf einer Diagonale lagen und sich durch teilweisen Zerfall in kleinere Untereinheiten separierten. Die Proteine sind bereits in der ersten Dimension denaturiert worden und in der zweiten Dimension erfolgte eine Auftrennung in

Untereinheiten. Diese zweidimensionale Gelelektrophorese zeigt, dass sich die Lupinenproteine Conglutin α und Conglutin β und ihre Isoformen durch die Reduktion in kleinere Untereinheiten zerlegen ließen. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, erfolgte die Trennung der Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes mit der Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht. Für eine optimale Auftrennung des Lupinenmehlsextraktes konnte zunächst eine isoelektrische Fokussierung in einem pH-Bereich von 3-10 durchgeführt werden, um einen Gesamtüberblick über die Lupinenproteine zu erhalten. Die anschließende zweite Dimension wurde in einem 4-20 %igen NUPAGE-Gel durchgeführt. Zunächst wurde das Lupinenmehlsextrakt in der 2D-PAGE (Abb. 17) aufgetrennt und die einzelnen Spots anschließend mit der MALDI/TOF-TOF (Tab. 11) weiter analysiert.

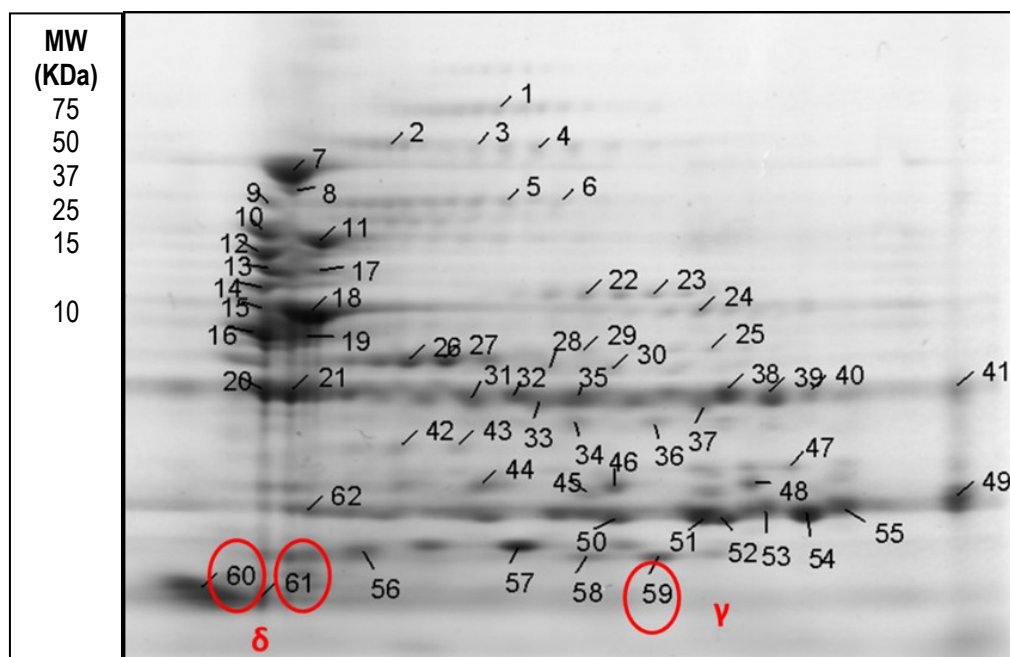


Abb. 17: 2D SDS PAGE der Lupinenproteinen. IEF im pH-Gradienten von pH 3 - 10, 4 - 20 % NUPAGE Bis-Tris-Gel. Coomassie-Färbung.

In der 2D-PAGE konnten zunächst vier Bereiche deutlich voneinander abgegrenzt werden. Im sauren Bereich bei einem pH von 4-5 ließen sich 20 einzelne Spots (7-21, 56, 61, 62) finden, die jeweils ineinander überzugehen schienen. Zudem waren 26 basische Spots im pH-Bereich von 5-10 zu sehen, die aber nicht vollständig voneinander trennbar waren. Im basischen Bereich konnten die Spotsnummer 41 und 49 gefunden werden, die deutlich mehr Protein enthielt. Insgesamt ließen sich alle Bereiche eindeutig zuordnen.

Tab. 11: Conglutinfamilien und dessen Isoformen

Spot identität	Spot-Nummer
$\alpha 1$	8,15,16,18,19,24,45,46,62
$\alpha 2$	7,8,9,10,12,13,14,15,17,19,51,54,
$\alpha 3$	11,17,18
$\beta 1$	22,23,25,26,27,28,29,49,56,57,58,
$\beta 2$	1,2,5,6,8,9,11,15,17,19,20,27,28,30,45,47,49,50,51,52,53,55,62
$\beta 3$	21,31,32,33,34,35,36,37,41,
$\beta 4$	3,4,25,26,29,38,39,40,42,43,44,46,48,
$\beta 5$	1,5,6,24,34,36,40,47,61,
$\beta 7$	21
γ C-Terminal Fragment	59
$\delta 1$	60,61,

4.3.4 Proteinidentifikation MALDI/TOF-TOF

Diese Untersuchung wurde am Proteomzentrum der Universität Rostock von Herrn Dr. Mikkat durchgeführt.

Nachfolgend werden die Spots der 2D-elektrophoretisch getrennten Lupinenproteinen dargestellt. Die Abb. 17 zeigt die Spots der 2D-elektrophoretisch getrennten Proteinen des Lupinenmehlisolates. Die getrennte Proteinmenge entspricht 200 μg . Die Ergebnisse der MALDI-TOF/TOF-Untersuchungen wurden mittels der Aufnahme von MS/MS-Spektren ausgewählter Peptide derselben Probe ausgewertet. Die Identität jedes Spots ist in der Tab. 11 und Abb. 18 und 19 dargestellt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 12 aufgelistet. Die Datenbankrecherchen erfolgten mit dem MASCOT protein identification system (Matrix Science, London, UK). Das Identifizierungskriterium war ein signifikanter Mascot Score ³ 72 ($p < 0,05$). Der Score wird beschrieben durch $-10 \cdot \log(P)$, wobei P die Wahrscheinlichkeit ist, mit der die Übereinstimmung zufällig ist. Die Sequenzübereinstimmung beschreibt den prozentualen Anteil, mittels MALDI-TOF identifizierter Sequenz, des jeweiligen Proteins.

In den untersuchten Spots des Gels war $\beta 2$ am stärksten vertreten, gefolgt von $\beta 1$. Neun Spots konnten $\beta 3$ zugeordnet werden, dreizehn $\beta 4$, neun $\beta 5$ und nur ein Spot konnte $\beta 7$ zugeordnet werden. Es konnten keine Spots nachgewiesen werden, die dem $\beta 6$ Protein entsprachen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere unentdeckte B-Isoformen in diesen Spots vorhanden sind. Darüber hinaus könnte eine Peptid-Kontamination von Spots vorhanden sein, die nicht ausreichend getrennt worden sind. Neun Spots stimmten mit $\alpha 1$ überein, zwölf mit $\alpha 2$ und nur 3 mit $\alpha 3$. Vom Conglutin γ konnte nur der C-Terminus identifiziert werden. Conglutin δ konnten nur 2 Spots zugeordnet werden. Diese Studien zeigen, dass *Lupinus angustifolius* über mindestens 11 Speicherproteine verfügt, die vier Familien zugeordnet werden können.

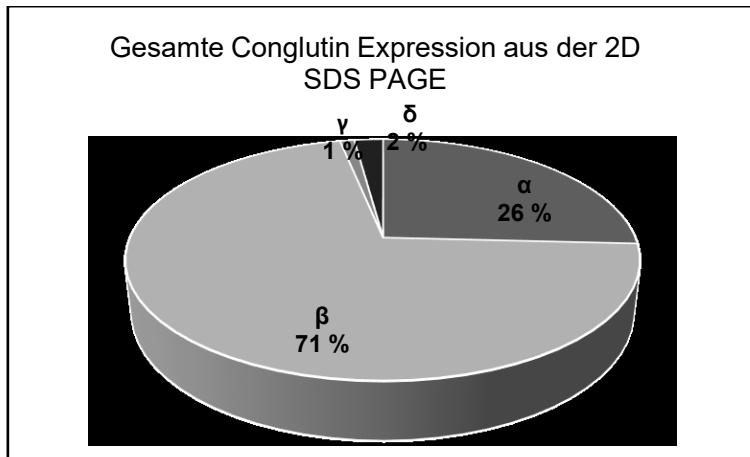


Abb. 18: Gesamte Conglutin Expression (*Lupinus angustifolius*) mittels 2D DS-PAGE und MALDI-TOF.

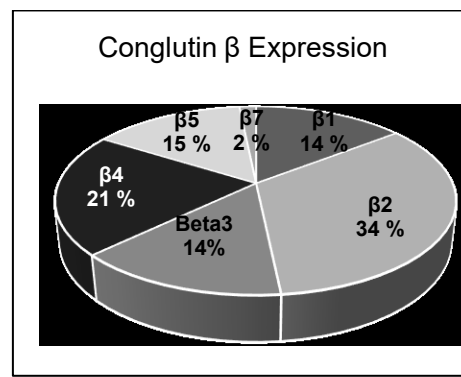
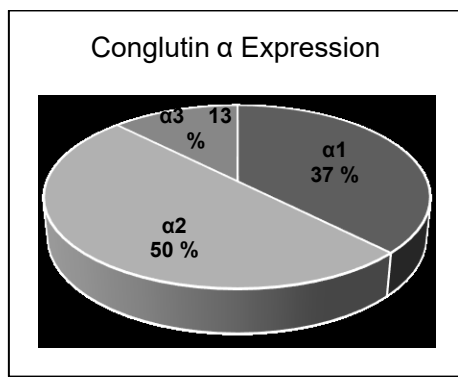


Abb. 19: Conglutin α und β Expression mittels 2D SDS-PAGE und MALDI-TOF der *Lupinus angustifolius*.

Tab. 12: Proteinidentifikation der 2D SDS PAGE

Spot	Score	Proteinname (Conglutin)	Spot	Score	Proteinname (Conglutin)
1	461	β 5 , β 2	33	219	β 3
2	314	β 2	34	228	β 3 , β 5
3	315	β 4	35	219	β 3
4	361	β 4	36	217	β 3 , β 5
5	412	β 5 , β 2	37	201	β 3
6	337	β 5 , β 2	38	184	β 4
7	247	α 2	39	206	β 4
8	429	α 2 , α 1 , β 2	40	236	β 4 , β 5
9	261	α 2 , β 2	41	188	β 3
10	168	α 2	42	152	β 4
11	286	α 3 , β 2	43	193	β 4
12	171	α 2	44	144	β 4
13	189	α 2	45	211	α 1 , β 2
14	141	α 2	46	183	β 4 , α 1
15	203	α 2 , α 1 , β 2	47	221	β 5 , β 2
16	133	α 1	48	125	β 4
17	287	α 3 , α 2 , β 2	49	212	β 1 , β 2
18	172	α 1 , α 3	50	99	β 2
19	182	α 2 , α 1 , β 2	51	94	β 2 , α 2
20	137	β 2	52	90	β 2

21	204	β 3 , β 7	53	148	β 2
22	236	β 1	54	92	α 2
23	248	β 1	55	151	β 2
24	195	β 5 , α 1	56	135	β 1
25	269	β 1 , β 4	57	134	β 1
26	219	β 1 , β 4	58	112	β 1
29	303	β 4 , β 1	59	76	γ [C-term Frag]
30	253	β 2	60	119	δ 1
31	224	β 3	61	102	β 5 , δ 1
32	225	β 3	62	194	β 2 , α 1

4.4 Proteinmodifikationen

Für die Beurteilung der Anwendbarkeit der fünf verschiedenen Proteinmodifikationen ist es von Bedeutung, dass sichergestellt ist, dass die Proteine der *Lupinus angustifolius* während der Proteinbehandlung in ihrem allergenen Potenzial verändert werden.

4.4.1 Einfluss von Erhitzungsprozessen auf die Allergene der Lupinenproteine

Die Untersuchung des Einflusses von Erhitzungsprozessen auf das allergene Potenzial der *Lupinus angustifolius* erfolgte exemplarisch anhand von Erhitzungsversuchen im Trockenschrank und im Autoklaven. Der Erhitzungsprozess wurde jeweils durch eine Veränderung der Temperatur sowie der Erhitzungsdauer variiert. Die Untersuchungen wurden mit den unbehandelten Lupinenproteinen als Referenz durchgeführt.

Zunächst erfolgte eine Erhitzung des Lupinenmehls bei einer konstanten Temperatur von 100, 150 oder 200 °C. Die Erhitzungsdauer variierte zwischen 5, 15 und 30 min. Des Weiteren wurden die Proteine im Autoklav mit einer konstanten Erhitzungsdauer von 1 h bei einer T von 121 °C und einem Druck von 1,6 bar behandelt.

Der Proteingehalt hat sich nach dieser Behandlung signifikant zur Kontrolle verändert. Bei einer T von 100 und 150 °C ist der Gehalt ohne Veränderungen geblieben, nur bei einer T von 200 °C hat sich der Proteingehalt von 83 % nach den ersten 5 min auf 57 % nach 30 min signifikant vermindert (Abb. 20).

Eine Auswahl von mittels SDS-PAGE getrennten und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Proteinextrakten der erhitzten Lupinenproteine zeigt Abb. 21.

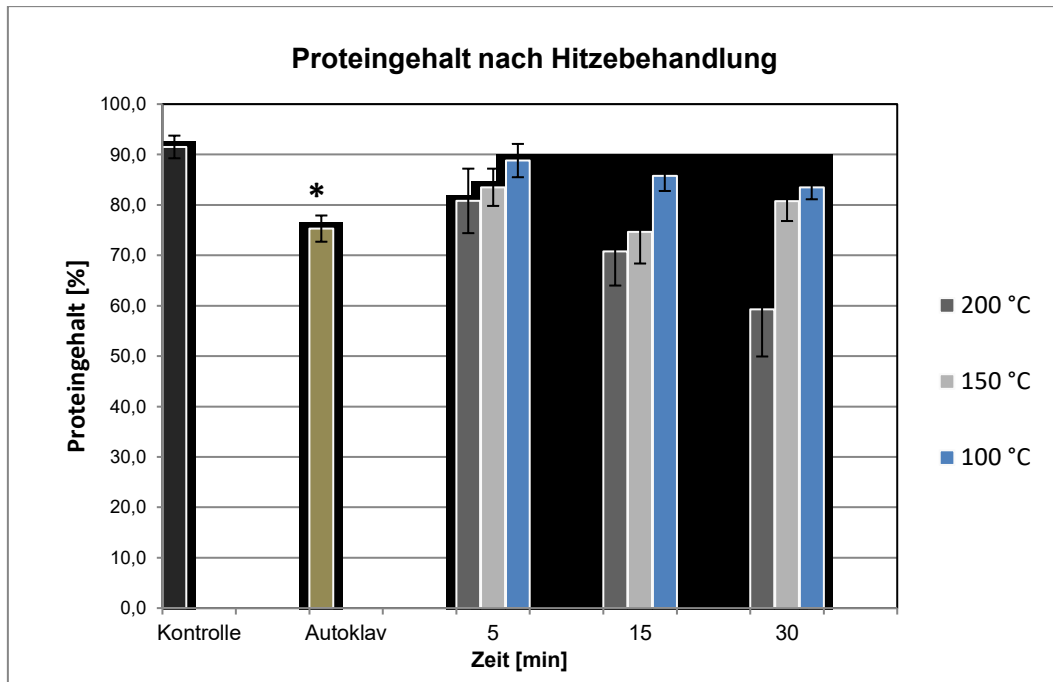


Abb. 20: Proteingehalt in [%] der Lupinenextrakte nach Hitzebehandlung im Autoklav und im Trockenschrank in unterschiedlichen Zeitintervallen. Bestimmung nach BCA. Statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels ANOVA einfaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Test Bonferroni. * (signifikant): $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (unbehandeltes Lupinenmehl); Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardabweichung von ($n = 4$).

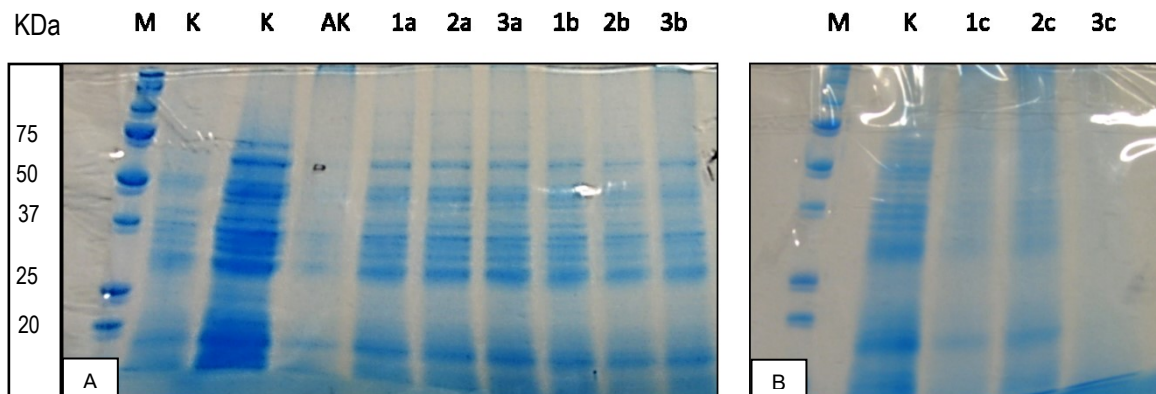


Abb. 21: Gesamtproteinmuster des erhitzten Lupinenmehls im Ofen und im Autoklav. A) M: Marker, K: Kontrolle (unbehandeltes Lupinenproteinisolat), AK: Autoklaviertes Lupinenmehl, 1a: 100 °C, 5 min, 2a: 100 °C 15 min, 3a: 100 °C 30 min, 1b: 150 °C, 5 min, 2b: 150 °C 15 min, 3b: 150 °C 30 min. B) 1c: 200 °C, 5 min, 2c: 200 °C 15 min, 3c: 200 °C 30 min

Die Bandenmuster der mittels SDS-PAGE getrennten Extrakte aus den erhitzten Lupinenmehl sind bei Temperaturen von 100 und 150 °C ähnlich und unterscheiden sich nur unwesentlich vom nativen Proteinextrakt, welches zahlreiche Proteinbanden im MG-Bereich von etwa 20 kDa bis 75 kDa zeigt. Bei einer Temperatur von 200 °C sind nur schwache Banden zu beobachten, die nach 30 min fast verschwunden sind. Intensive Banden sind in den Bereichen von ca. 70 kDa bis ca. 30 kDa sowie

10 kDa zu erkennen. Das bereits im Immunoblot als Hauptallergen der Lupinen bestimmte Protein mit einem MG von 75-25 kDa wird erst nach einer Erhitzungstemperatur im Autoklav ($T=110\text{ }^{\circ}\text{C}$) nicht mehr detektiert.

Aufgrund der Bandenmuster sowie des Proteingehalts wurde nur aus der autoklavierten Probe die EAST Inhibition und der Immunoblot durchgeführt. Die anderen Erhitzungsparameter wurden nicht berücksichtigt, da es keinen Unterschied zu dem nativen Proteinextrakt gab. Eine Temperatur von $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ kann die Proteinqualität beeinträchtigen.

Die Abb. 22 zeigt die Ergebnisse einer mit den aus dem autoklavierten Lupinenmehl gewonnenen Proteinextrakten durchgeführten EAST-Inhibition. An die Festphase sind die Proteine der Sorte Boregine gekoppelt. Diese Abb. zeigt deutlich, dass, die Inhibitionsgraphen des autoklavierten Lupinenmehls nahezu identisch verlaufen und sich auch vom Graphen des nativen, an die Festphase gekoppelten Extraktes, kaum unterscheidet. Der dargestellte Kurvenverlauf bestätigt ein allergenes Potenzial des mit dem Autoklav behandelten Lupinenmehlisolats. Im Vergleich zu der Kontrolle (unbehandeltes Lupinenmehl) ist zwar eine Reduzierung der allergenen Potenz zu beobachten, jedoch beträgt diese bei einer Konzentration von $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ immer noch 70 %.

Offensichtlich hat eine Erhitzung der Lupinenproteine im Autoklaven auf $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei 1,6 bar, unabhängig von der Erhitzungsdauer von 60 min nur einen geringen Einfluss auf das allergene Potenzial.

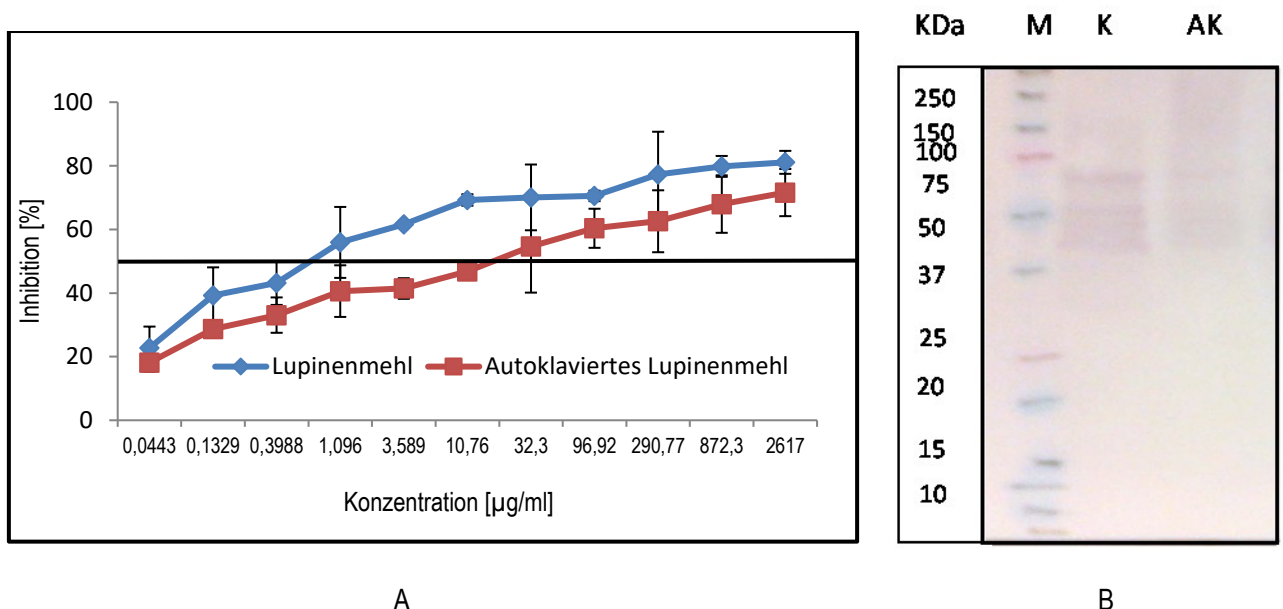


Abb. 22: A) EAST Inhibition des Lupinenmehlisolats als Kontrolle und des autoklavierten Lupinenmehls. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardabweichung. B) Immunoblot des Lupinenmehlisolates: M: Marker, K: Kontrolle (unbehandeltes Lupinenmehl), AK Autoklaviertes Lupinenmehl. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.4.2 Harnstoffbehandlung

Harnstoff ist in der Lage, manche Proteine in eine globuläre, teilweise denaturierte Form umzusetzen, wobei die ursprüngliche Struktur weitgehend erhalten bleibt.

Der Ausgangsproteingehalt von 93 % in der unbehandelten Kontrolle hat sich um ca. 4 % auf 89 % nach der Behandlung reduziert. Zeigte dabei kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle (Abb. 23).

Die mittels SDS-PAGE getrennten und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Lupinenproteine die mit Harnstoff behandelt wurden, sind in Abb. 23 dargestellt. In der Abb. sind verschiedene Proteinbanden im MG-Bereich >12 kDa bis < 100 kDa erkennbar. Neben diffusen Anfärbungen im höhermolekularen Bereich können intensive Banden mit MG von 95, 75, 37, 30, 17 und 13 kDa eindeutig zugeordnet werden.

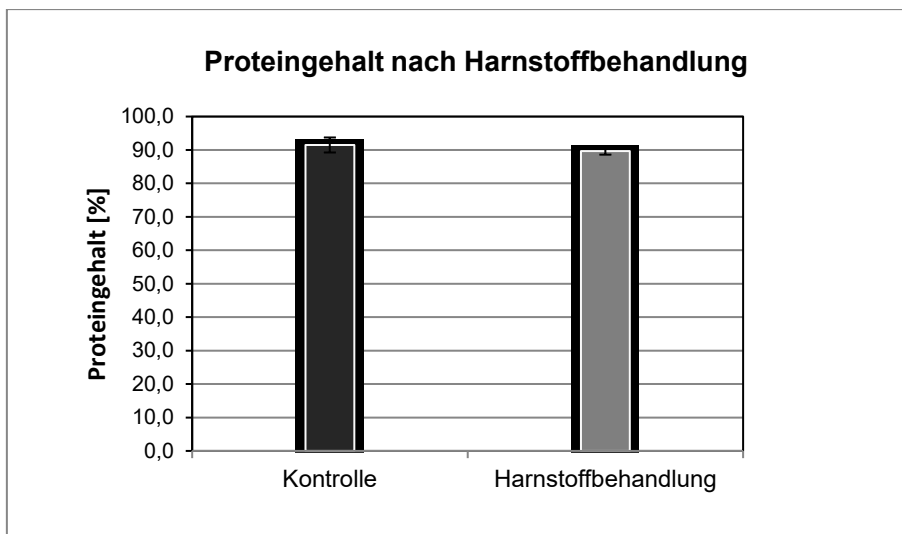


Abb. 23 Proteingehalt in [%] der Lupinenextrakte nach Hitzebehandlung im Autoklav und im Trockenschrank in unterschiedlichen Zeitintervallen. Bestimmung nach BCA. Statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels ANOVA einfaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Test Bonferroni.* (signifikant): $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (unbehandeltes Lupinenmehl); Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardabweichung von ($n = 4$).

Im Immunoblot (Abb. 24) heben sich Banden im MG-Bereich von > 18 bis < 100 kDa hervor (im Vergleich zur Kontrolle). Die ersten Proteinbanden im MG-Bereich von 100 und 150 kDa zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf auf, verschwinden jedoch nach der Behandlung mit Harnstoff. Die stark ausgeprägten Banden befinden sich im Größenbereich von 75, 40 und 12 kDa. Allerdings ist die 12 kDa Bande bei dieser Modifikation etwas schwächer als die der Kontrolle. Trotzdem kann sehr gut beobachtet werden, dass es mit einer Harnstoffbehandlung nicht möglich ist, eine Reduzierung der Allergenität zu erreichen. Eine EAST-Inhibition wurde nicht durchgeführt.

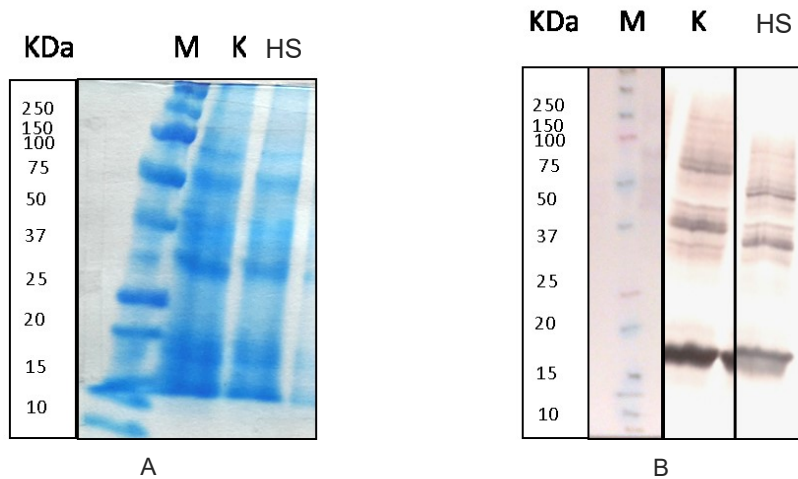


Abb. 24: A) SDS PAGE der Lupinenproteine sowie Lupinenproteine die mit Harnstoff behandelt wurden. M: Marker, K: Kontrolle, unbehandeltes Lupinenmehl, HS: Harnstoffbehandlung. B) Immunoblot der Lupinenproteine und mit Harnstoff behandeltes Lupinenproteine. M: Marker, K: Kontrolle, unbehandeltes Lupinenmehl, HS: Harnstoffbehandlung.

4.4.3 Reduktion/Alkylierung

Für bestimmte Allergene der gleichen Konformationsepitope gilt Reduktion und Alkylierung als eine geeignete Strategie zur Entfaltung von Proteinen und Reduzierung der Allergenität. Der Proteingehalt nach der Reduktion und Alkylierung wurde mit der BCA Methode analysiert und zeigte einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Der Proteingehalt betrug 97 % (Abb. 25), während der des unbehandelten Lupinenmehls bei 93 % lag. Der Unterschied beruht möglicherweise darauf, dass bei der Behandlung kleine Peptide entstanden sind.

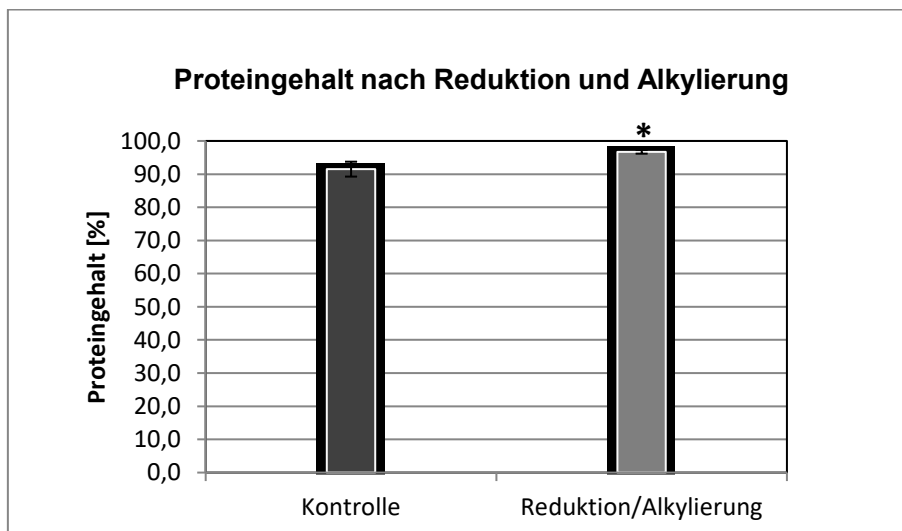


Abb. 25: Proteingehalt in [%] der Lupinenextrakte nach Reduktion und Alkylierung. Bestimmung nach BCA. Statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels ANOVA einfaktorielles Varianzanalyse mit Post-hoc-Test Bonferroni. * (signifikant): $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (unbehandeltes Lupinenmehl); Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardabweichung von ($n = 4$).

Die reduzierten und alkylierten Lupinenproteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Abbildung 26 zeigt die so entstandenen Proteinbanden im MG-Bereich >12 kDa bis < 75 kDa. In der Spalte der Reduktion/Alkylierung können im Vergleich mit der Kontrolle intensivere Banden mit MG von 70, 50, 37, 14 und 12 kDa eindeutig zugeordnet werden. Im Immunoblot stellt sich der Effekt ähnlich dar: die Banden der reduzierten und alkylierten Proteine sind stärker ausgeprägt.

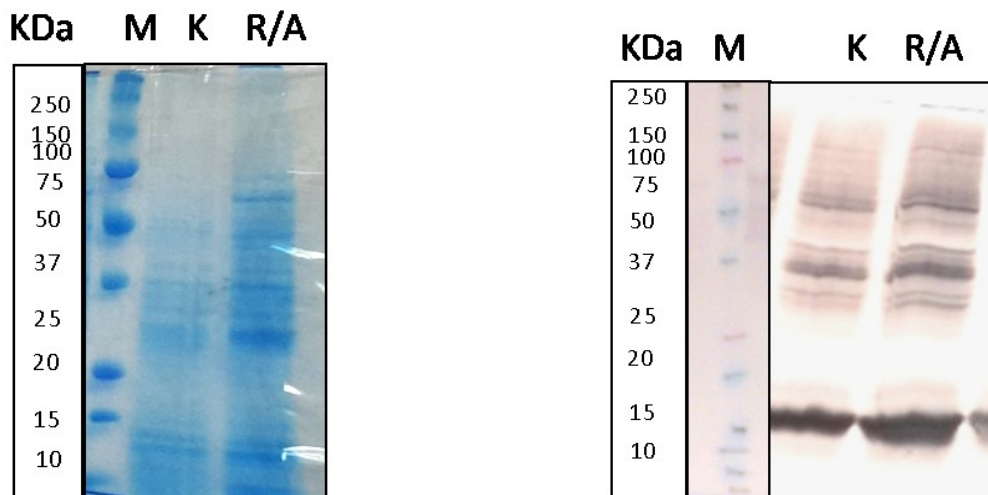


Abb. 26: SDS-PAGE und Immunoblot der Lupinenproteine und Lupinenproteinmodifikationen die reduziert und alkyliert wurden. M: Marker, K: Kontrolle: unbehandeltes Lupinenmehl, R/A: Reduziert/Alkyliert.

Diese Abbildung lässt erkennen, dass die Spaltung der Disulfidbrücken mittels Reduktion und Alkylierung keinerlei Reduktion der Allergenität bewirkt. Eine EAST-Inhibition wurde nicht durchgeführt.

4.4.4 Aktivkohlebehandlung

In diesem Test wurden Lupinenallergene mit Aktivkohle (AC) unter verschiedenen Konditionen koinkubiert. Der Proteingehalt wurde vor und nach der Inkubation mit der BCA Methode analysiert. Die Abb. 27 zeigt Messwerte des Proteingehalts. Die AC Mengen werden als Verhältnisse von mg Aktivkohle je mg Protein dargestellt. Es kann beobachtet werden, dass durch die Steigerung der Menge an AC progressiv der Proteingehalt signifikant sinkt. Für die 60:1 AC-Protein-Ratio ist ein sehr niedriger Gehalt an löslichem Protein mit der BCA Proteinbestimmung Methode nachweisbar.

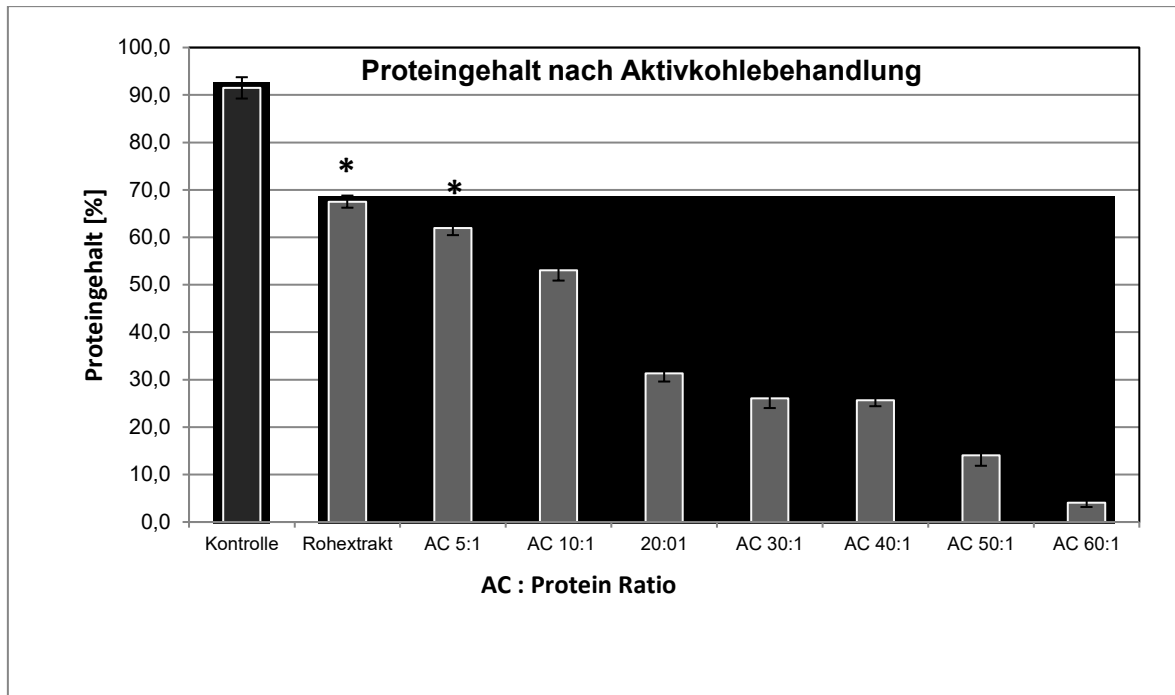


Abb. 27: Proteingehalt der Lupinenproteine nach Koinkubation mit Aktivkohle (AC) in [%]. K: Kontrolle: unbehandeltes Lupinenmehl. Rohextrakt: Lupinenmehlisolat in 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,5 mit 100 mM NaCl) inkubiert, AC : Protein Ratio = Gewichtsproteinverhältnisse. Bestimmung nach BCA. Statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels ANOVA einfaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Test Bonferroni. * (signifikant): $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (unbehandeltes Lupinenmehl); dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von ($n = 4$).

Die mittels SDS-PAGE getrennten und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Lupinenproteine, die mit Aktivkohle koinkubiert wurden, sind in Abb. 27 dargestellt. Die Abbildung zeigt verschiedene Proteinbanden im MG-Bereich >10 kDa bis < 50 kDa auf. In der Spalte 5:1, 10:1, 20:1 und 30:1, die zur Koinkubation mit Aktivkohle gehören, können Banden mit MG von 50, 37, 20, 14,12 kDa eindeutig zugeordnet werden. In der Kontrolle sind diese Banden ebenfalls zu beobachten. Ab einer 40:1 AC:Protein Ratio sind keine Proteinbanden mehr nachweisbar (Abb. 28). Für den Immunoblot wurden die Spalten der 10:1 und 40:1 AC:Protein Ratio ausgewählt und beide zeigten fast das gleiche Muster wie das unbehandelte Lupinenmehl, nur dass die Banden bei ca. 90 kDa im SDS-PAGE und Immunoblot etwas stärker gefärbt sind als in der Kontrolle.

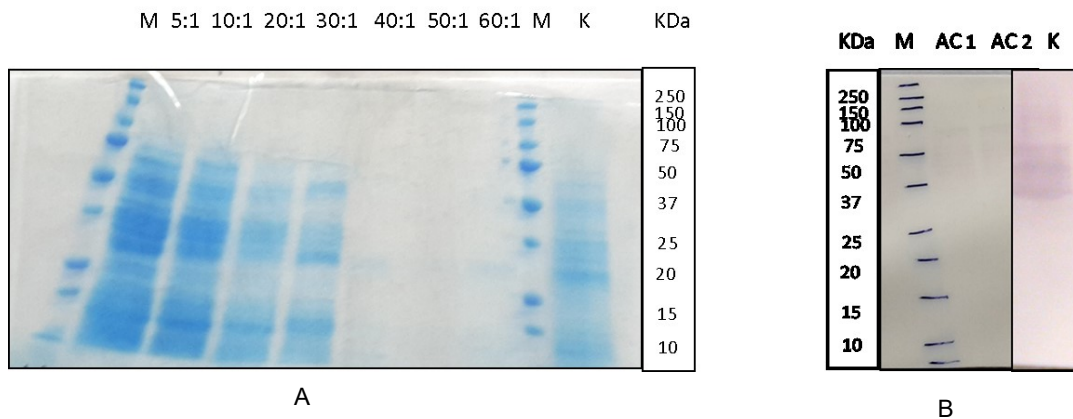


Abb. 28: A) SDS PAGE der Lupinenproteine und Lupinenproteine, die mit Aktivkohle AC koinkubiert wurden. M: Marker, K: Kontrolle unbehandeltes Lupinenmehl, AC1: 10:1, AC2: 40:1 AC:Protein Ratio = Gewichts Protein-Verhältnisse. B) Immunoblot der Lupinenproteine und Lupinenproteine, die mit Aktivkohle AC koinkubiert wurden. M: Marker, K: Kontrolle unbehandeltes Lupinenmehl, AC1: 10:1, AC2: 40:1 AC:Protein Ratio. (Das Serum für diesen und den folgenden Immunoblot stammt aus einem Pool mit geringerer EAST Klasse als in den vorangegangenen Modifikationen, daher stellen sich die Banden weniger deutlich dar.)

4.4.5 Tanninbehandlung

Tannine gehören zu den pflanzlichen Sekundärstoffen und enthalten ausreichend phenolische Ortho-di-Hydroxygruppen, weshalb sich leicht Quervernetzungen zwischen Makromolekülen der Proteine ausbilden. Solche Vernetzungen hemmen die Aktivität von Pflanzenenzymen und -organellen. Tannine bilden unlösliche Komplexe mit Proteinen. Das Ziel war die Entfernung der Lupinenallergene als unlöslicher Tanninsäurekomplex, unter Verwendung verschiedener Tanninkonzentrationen. Vor allen Schritten wurde stets eine 1D SDS-PAGE, ein Immunoblot und eine EAST Inhibition durchgeführt.

Die Abb. 29 zeigt das qualitative Ergebnis der SDS-PAGE des behandelten Lupinenmehlisolates mit verschiedenen Tanninsäurekonzentrationen und Stufen der Behandlung (S1, S2, S3).

Die Abb. 30 weist verschiedene Proteinbanden im MG-Bereich >12 kDa bis <75 kDa auf. In den meisten Spalten können intensive Banden mit MG von 75, 50, 37, 30, und 14 kDa eindeutig zugeordnet werden. In der höchsten Konzentration von 2,0 mg/ml Tanninsäure sind keine Banden mehr vorhanden (z.B. Bande Nr. 5, 8, 9 und 13). Im Immunoblot konnte eindeutig eine positive Reaktion auf Lupinenallergene mittels Lupinenallergikerserum in den Spalten S1 1,0 und S3 1,0 beobachtet werden. In S2 1,0 sind keine Banden erkennbar, da der pH 2,0 ist. In der Spalte S3 1,0 ist eine Bande bei ca. 40 kDa sichtbar.

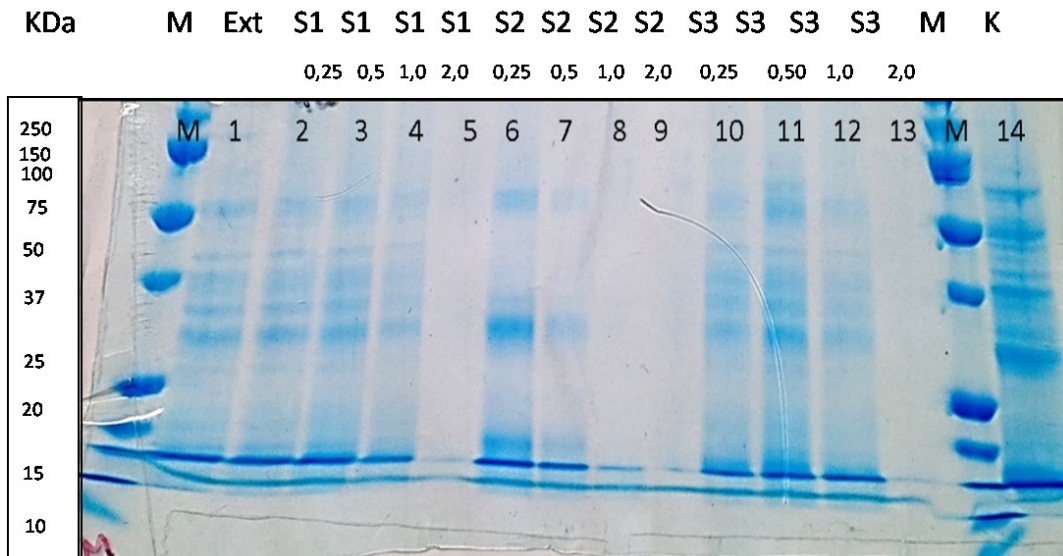


Abb. 29: 1D SDS-PAGE der behandelten Lupinenallergene mit Tanninsäure. M: Marker, 1: Extrakt; 2: 1. Überstand S1 0,25 mg/ml; 3: 1. Überstand S1 0,50 mg/ml; 4: 1. Überstand S1 1,0 mg/ml; 5: 1. Überstand S1 2,0 mg/ml; 6: 2. Überstand S2 0,25 mg/ml; 7: 2. Überstand S2 0,50 mg/ml; 8: 2. Überstand S2 1,0 mg/ml; 9: 2. Überstand S2 2,0 mg/ml; 10: 3. Überstand S3 0,25 mg/ml; 11: 3. Überstand S3 0,50 mg/ml; 12: 3. Überstand S3 1,0 mg/ml; 13: 3. Überstand S3 2,0 mg/ml; K: Kontrolle: unbehandeltes Lupinenmehlisolat.

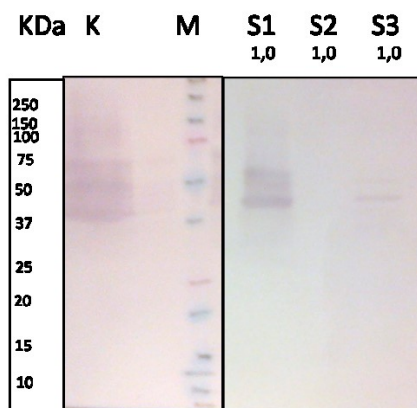


Abb. 30: Immunoblot der mit Tanninsäure behandelten Lupinenallergene. M: Marker; K: Kontrolle (unbehandeltes Lupinenmehl) S1 1,0 (1. Überstand); S2 1,0 (2. Überstand) S3 1,0 (3. Überstand). Wie auch beim letzten Immunoblot stammt hier das Serum aus einem Pool mit geringerer EAST Klasse, daher sind die Banden nicht so deutlich wie in den ersten Untersuchungen.

Für den immunologischen Nachweis der behandelten Lupinenallergene wurden zwei verschiedene Verfahren angewendet: Immunoblot und EAST-Inhibition. Für den Immunoblot wurden nur die Konzentration von 1,0 mg/ml Tanninsäure und die 3 Stufen (S1, S2, S3) der Behandlung verwendet. 1 mg/ml Tanninsäure wurde gewählt, da in diesem Stadium keine Freisetzung von Allergenen beobachtet wurde.

Mit dem EAST-Inhibitionstest ist es möglich, eine relative Quantifizierung des allergenen Potenzials durchzuführen. Hier wurden das Lupinenmehlisolat (Kontrolle) und das behandelte Lupinenmehl

quantifiziert. Das im EHT eingesetzte Lupinen-Erdnuss-Sojapoolserum (EAST Klasse 3,6) wurde 1:2 verdünnt (Kaliumphosphatpuffer). Von den drei Extrakten wurden jeweils Verdünnungsreihen (11 Stufen) erstellt. Die Messungen erfolgten in Doppelbestimmung. Zur Beurteilung der allergenen Potenz eines Extraktes ist es wichtig, dass der 50 %-ige-Hemmwert überschritten werden muss, was bei den Tanninsäurebehandlungsextrakten gegeben war (Abb. 31).

Die in Abb. 31 dargestellten Kurvenverläufe bestätigten jeweils ein allergenes Potenzial bei den behandelten Lupinenmehlisolaten mit den verschiedenen Tanninsäurekonzentrationen. Im Vergleich zur Kontrolle (unbehandeltes Lupinenmehl) ist keine Hemmung des allergischen Potenzials von etwa 80 % erkennbar.

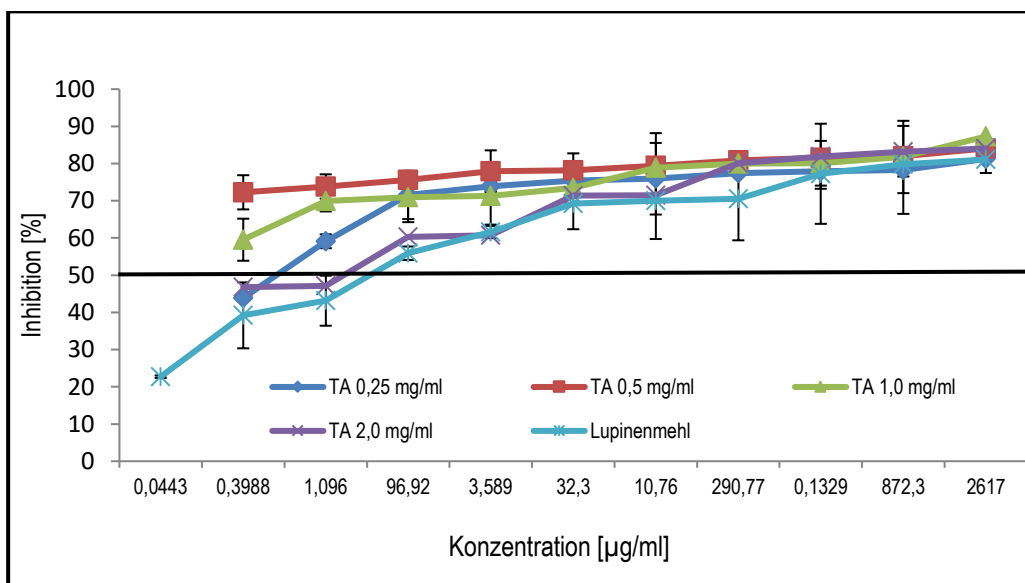


Abb. 31: Quantifizierung des allergenen Potenzials des Lupinenmehlisolates als Kontrolle und des mit Tanninsäure (TA: Tanninsäure Konzentrationen von 0,25 mg, 0,50 mg, 1,0 mg, 2,0 mg) behandelte Lupinenmehl. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardabweichung.

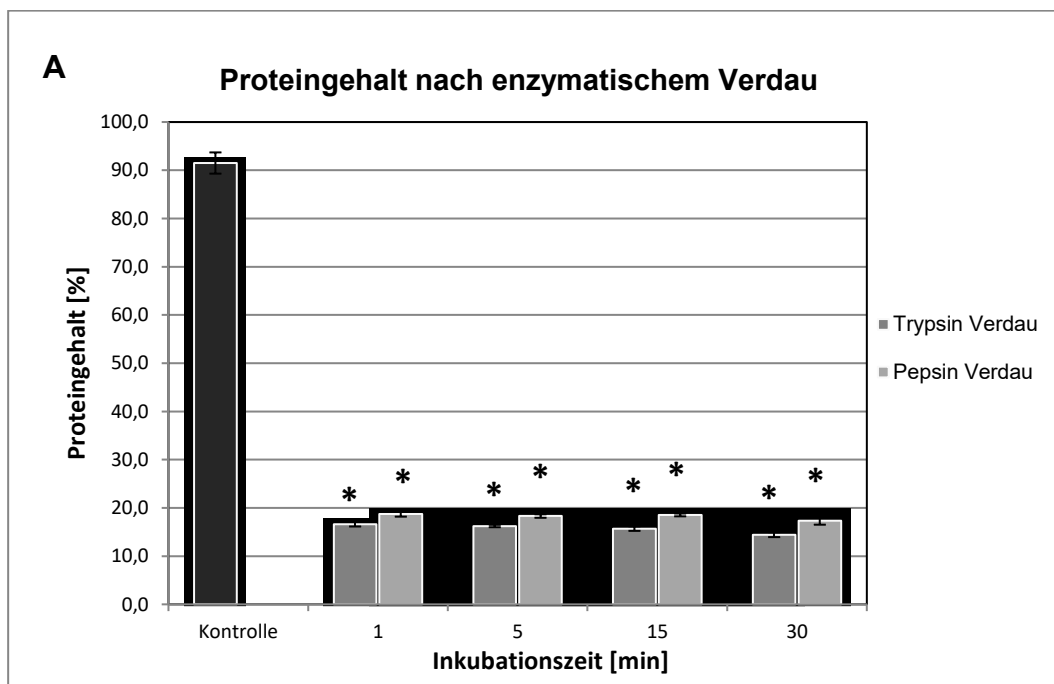
4.5 Proteinstabilitätsuntersuchung

4.5.1 *in vitro* Verdau

Zur Bestimmung des allergenen Potentials von Proteinen zählt auch die Prüfung der Stabilität gegenüber enzymatischem Verdau. Zur Untersuchung der Stabilität der Lupinenproteine gegen einen enzymatischen Verdau (Amylase, Pepsin, Trypsin) wurde eine Hydrolyse mit dem Lupinenmehlisolat durchgeführt. Besondere Aufmerksamkeit wurde dabei auf die Prüfung der Stabilität gegen die Endopeptidase Pepsin gelegt. Die Stabilität der Proteine gegenüber Amylasen, die bei Verdauungsschritten im Speichel eine Rolle spielen, wurde nicht berücksichtigt, da diese Enzyme lediglich Polysaccharide spalten. Das Lupinenmehlisolat wurde in Wasser homogenisiert und der pH-Wert der Suspension auf das Aktivitätsoptimum des Verdauungsenzyms Pepsin (pH 1,5)

bzw. Trypsin (pH 7,8) eingestellt. Der Ansatz inkubierte bei 37 °C auf einem Schüttler. In Zeitintervallen (1, 5, 15 und 30 min) wurden Proben von diesem Ansatz entnommen. Durch sofortige Neutralisierung des pH-Wertes (pH 7) konnte die Enzymaktivität des Pepsins inhibiert werden. Gleichzeitig erfolgte eine Lagerung der neutralisierten Proben auf Eis. Bei der Trypsinierung war es nicht nötig diese Proben zu neutralisieren. Die Quantifizierung der Lupinenproteine erfolgte mittels Proteinbestimmung (Pierce BCA Protein Assay Kit. IL. U.S.A.) und die Quantifizierung des relativen allergenen Potenzials der Proteinextrakte mit dem EAST-Hemmtest. Die Abb. 32 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen zur Abbaukinetik der Lupinenproteine durch die Verdauungsenzyme Pepsin und Trypsin mit signifikantem Unterschied zur Kontrolle (unbehandeltes Lupinenmehl). Die Abbildung des Verdaus durch Trypsin und Pepsin zeigt jeweils einen deutlichen Abbau. Doch auch nach einer Reaktionszeit von 30 min sind die Proteine mit beiden Detektionssystemen BCA und EAST Hemmtest noch nachweisbar. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Lupinenproteine sehr stabil sind.

Das Ergebnis im Trypsinverdaus weist deutlich darauf hin dass, der Zeitfaktor eine wesentliche Rolle während des Verdaus spielt.



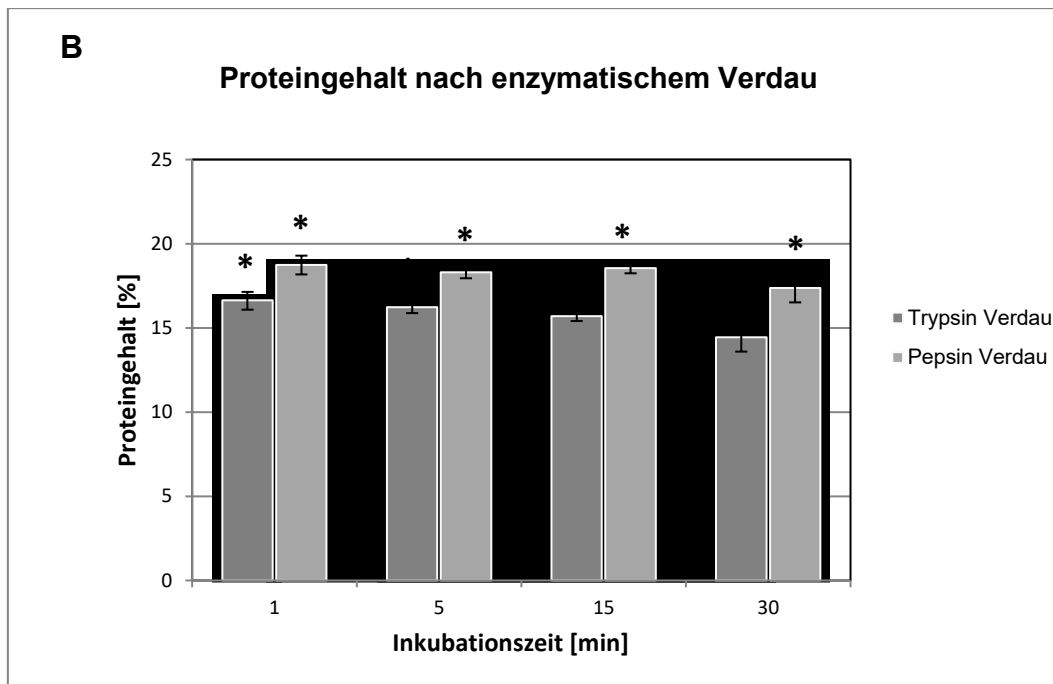


Abb. 32: A) Proteingehalt in [%] des Lupinenmehls nach enzymatischem Verdau mit Trypsin und Pepsin. Als Kontrolle diente unbehandeltes Lupinenmehlisolat. B) Proteingehalt des Lupinenmehls nach enzymatischem Verdau mit Trypsin und Pepsin ohne Kontrollwert. Bestimmung nach BCA. Statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede erfolgte mittels ANOVA einfaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Test Bonferroni.* (signifikant): $p \leq 0,05$ im Vergleich zur Kontrolle (unbehandeltes Lupinenmehl); Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardabweichung von ($n = 4$).

4.5.2 Quantifizierung des relativen allergenen Potenzials der Proteinextrakte nach enzymatischem Verdau

Eine Methode zur Quantifizierung des relativen allergenen Potenzials eines Proteinextraktes ist die EAST-Inhibition (siehe 3.11). Diese wurde eingesetzt, um das allergene Potenzial der enzymatischen Verdauansätze mit dem des Kontrollwertes zu vergleichen. Abb. 33 zeigt die Inhibitionskurven der Enzyme des Verdau (Trypsin und Pepsin) und der Kontrolle. Die Messwerte und Berechnungen sind im Anhang dargestellt. Die Ergebnisse aller Inhibitionen beziehen sich auf die Konzentration des jeweiligen Verdünnungsschrittes des Kontrollwertes, um eventuell vorhandene matrixbedingte Fehler bei der Proteinbestimmung nach BCA auszuschließen [152].

Zur Beurteilung der allergenen Potenz eines Extraktes ist es wichtig, dass der 50 %-ige Hemmwert überschritten wird, was bei allen drei Extrakten gegeben war. Somit ist nachgewiesen, dass auch der Verdau durch Trypsin oder Pepsin die Allergenität der Lupinenproteine nur unwesentlich reduziert.

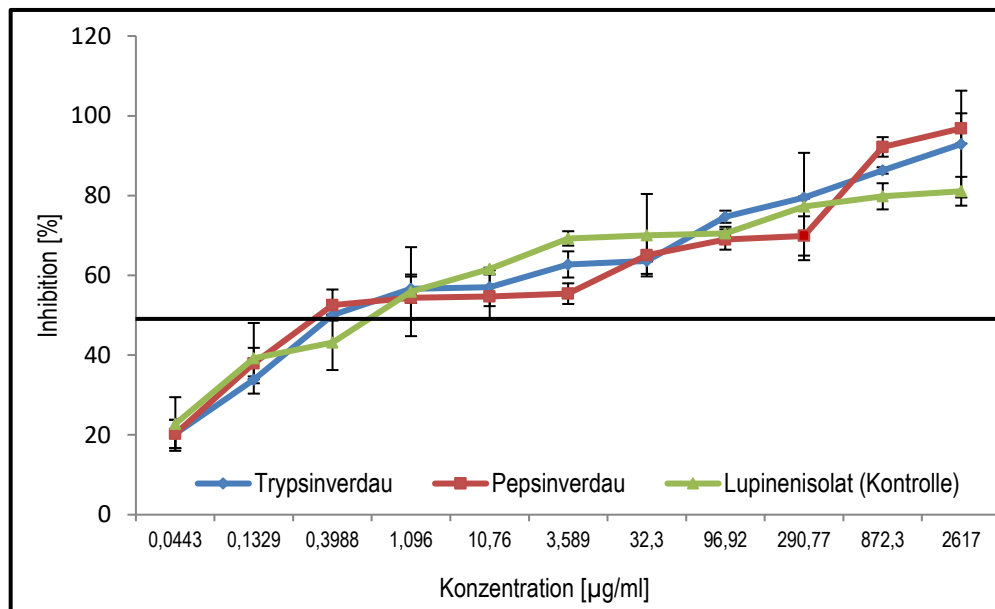


Abb. 33: EAST-Inhibition der Lupinenproteine nach enzymatischem Verdau mit Trypsin und Pepsin. Dargestellt sind der Mittelwert \pm Standardabweichung.

Weiterhin wurden Aliquote von beiden Verdauungsprozessen auf ein Elektrophoresegel aufgetragen und die Intensität der Enzymspaltprodukte nach Coomassie-Färbung bewertet. Folgende Abb. 34 zeigt ein Elektrophoresegel, auf welches die Lupinenproteine aus dem Lupinenmehlisolat nach 1-, 5-, 15- und 30-minütiger Behandlung mit Trypsin bzw. Pepsin aufgetragen. Es ist ein Unterschied in der Intensität der Bande (ca. 30 – 50 kDa) zwischen der Trypsinbehandlung und der Pepsinbehandlung zu erkennen. Nach 15 min Inkubationszeit mit Trypsin sind schwächere Banden zu beobachten. Bei der Pepsinbehandlung bleibt die Bande eher gleichmäßig. Lediglich der Rest der Proteinbanden, die in der Kontrolle bei ca. 75 – 20 kDa vorhanden sind, liegen nach Pepsinverdau bzw. nach Trypsinverdau nicht mehr vor. Im Immunoblot ist ebenfalls eine schwache Bande zu beobachten, allerdings nur bei dem Trypsin Verdau bei ca. 30 kDa.

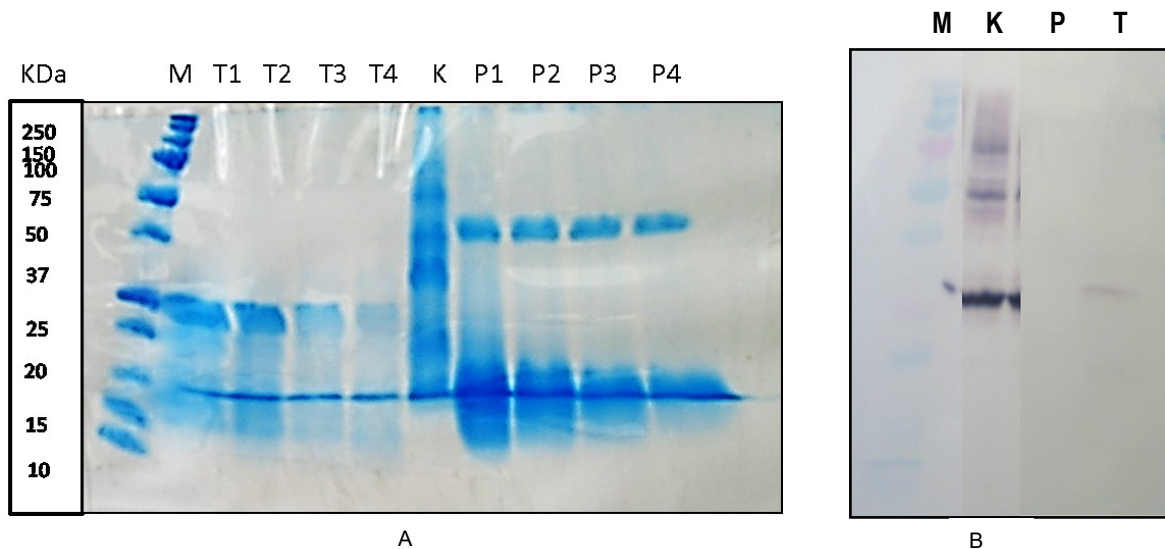


Abb. 34: A) SDS-PAGE der verdauten Lupinenproteine mittels Trypsin und Pepsin. M: Marker, T1: Trypsin Verdau, 1 min Inkubationszeit, T2: Trypsin, Verdau 5 min, T3: Trypsin, Verdau 15 min, T4: Trypsin, Verdau 30 min K: Kontrolle, unbehandeltes Lupinenmehl, P1: Pepsin, Verdau 1 min, P2: Pepsin, Verdau 5 min, P3: Pepsin, Verdau 15 min, P4: Pepsin, Verdau 30 min B) Immunoblot der verdauten Lupinenproteine mittels Trypsin und Pepsin. M: Marker, P: Pepsin, Verdau, T: Trypsin, Verdau.

4.6 *in silico*-Kreuzallergenitätsuntersuchung

Die Kriterien der FAO/WHO zur *in silico*-Allergenitätsprüfung sind in dem veröffentlichten Dokument „Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology“ (2001) aufgeführt. Nach diesen Vorschlägen sollten Untersuchungen auf Kreuzreaktivitäten vorgenommen werden, wenn mindestens einer der beiden folgenden Punkte zutrifft:

- mehr als 35 % Identität innerhalb eines Sequenzbereiches von 80 Aminosäuren des untersuchten Proteins mit einem bekannten Allergen [205, 214] oder
- Homologie von 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren in der Sequenz des untersuchten Proteins im Vergleich mit einem bekannten Allergen [205, 214]

Die Sequenzen der Lupinproteine wurden mit Sequenzen bekannter Allergene aus unterschiedlichen, internetbasierten Datenbanken verglichen. Um die Sequenzen vergleichen zu können, müssen diese in den sogenannten „single letter amino acid code“ gebracht werden [205]. Für die Lupinenproteine wurden 11 homologe Allergensequenzen detektiert. In Tab. 13 sind sämtliche mit der Datenbank SDAP (Sequence Database of Allergenic Proteins) identifizierten Allergene mit einer Homologie von mehr als 19 % aufgelistet. SDAP hat Zugriff auf die Datenbanken von PDB, MMDB-Entrez, SwissProt, NCBI-Entrez und PIR [205, 214]. Bei einem Abgleich der Aminosäuresequenzen der Lupinenproteine mit der Datenbank SDAP konnten 22 Übereinstimmungen von jeweils mehr als 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren gefunden werden. Es wurden Homologien zu den Allergenen Len c 1, Gly m 5, Ara h 1, Vig r 2, Jug r 2, Jug n 2, Ses i

3, Cor a 11, Pis v 3, Ana o 1 und Pru du 6 identifiziert, denen eine allergene Wirkung zugesprochen wird. Anhand der anderen beschriebenen Datenbanken konnten die gleichen Homologien zu bekannten Allergenen detektiert werden.

Tab. 13: Ergebnisse des *in silico*-Vergleichs der Lupinenproteine mit bekannten Allergenen, Identität von 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren. Abgleich mit FASTA 3.45

Alignment-nummer	Allergen	Sequenz Link in SwissProt/NCBI/PIR	Herkunft	Sequenz-länge	Sequenz-Übereinstimmung [%]
1	Lup an 1.0101	ACB05815	<i>Lupinus angustifolius</i>	611	100
2	Len c 1.0102	CAD87731	<i>Lens culinaris</i>	415	38,29
3	Len c 1.0101	CAD87730	<i>Lens culinaris</i>	418	38,14
4	Gly m 5.0201	Q9FZP9	<i>Glycine max</i>	559	44,81
5	Gly m 5.0101	O22120	<i>Glycine max</i>	543	43,72
6	Gly m conglycinin	CAA35691	<i>Glycine max</i>	605	45,12
7	Ara h 1	P43238	<i>Arachis hypogaea</i>	626	45,74
8	Ara h 1	P43237	<i>Arachis hypogaea</i>	614	44,96
9	Vig r 2.0201	B1NPN8	<i>Vigna radiata</i>	454	37,83
10	Vig r 2.0101	Q198W3	<i>Vigna radiata</i>	453	38,29
11	Gly m conglycinin	AAB01374	<i>Glycine max</i>	639	48,06
12	Gly m conglycinin	AAA33947	<i>Glycine max</i>	218	19,22
13	Gly m conglycinin	AAB23463	<i>Glycine max</i>	439	38,45
14	Jug r 2	AAF18269	<i>Juglans regia</i>	593	34,42
15	Jug n 2	AAM54366	<i>Juglans regia</i>	481	31,32
16	Ses i 3	AAK15089	<i>Sesamum indicum</i>	585	32,4
17	Cor a 11	AAL86739	<i>Corylus avellana</i>	448	25,43
18	Pis v 3.0101	EF116865	<i>Pistacia vera</i>	519	26,82
19	Ana o 1.0102	AAM73729	<i>Anacardium occidentale</i>	536	24,96
20	Ana o 1.0101	AAM73730	<i>Anacardium occidentale</i>	538	25,12
21	Pru du 6	3EHK_A	<i>Prunus dulcis</i>	531	19,22
22	Pru du 6.0101	ADN39440	<i>Prunus dulcis</i>	551	19,07

4.7 Zytotoxizitätsuntersuchung

4.7.1 Ausschluss der Zytotoxizität von Lupinen unter Verwendung von normalen humanen Leberzellen (Hepatozyten)

Für den Test wurden das Lupinenmehl sowie die Lupinenfasern und Lupinenflocken in vier unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (unverdünntes Material, sowie die Verdünnungen 1:2, 1:50, 1:100) verwendet. Da nur Material eines einzelnen Spenders zur Verfügung stand, wurden die Hepatozyten auf drei Zellkulturplatten aufgeteilt. Darauf wurde der LDH-Test jeweils vier Bestimmungen pro Konzentration durchgeführt.

4.7.2 LDH Zytotoxizitätstest

Mit dem LDH-Test konnte überprüft werden, ob verschiedene Proteinkonzentrationen des Lupinenproteins und seine Fraktionen eine zytotoxische Wirkung auf die Leberzellen haben. Die Ergebnisse ergeben sich aus den Mittelwerten dieser 3 durchgeführten Versuchsreihen mit den jeweiligen Vierfachbestimmung pro Konzentration und den daraus berechneten Standardabweichungen. Die Abszissenachse gibt den prozentualen Anteil toter Zellen im Vergleich zu der

positiven Kontrolle an, die für 100 % Zytotoxizität steht. Auf der Ordinatenachse sind die drei Lupinenfraktionen und die vier verschiedenen Proteinkonzentrationen dargestellt. Aus der Abb. 35 wird ersichtlich, dass alle Proteinfractionen (Lupinenfasern, -flocken und Isolate) in allen Proteinkonzentrationen keine zytotoxische Wirkung auf diese Zelllinie ausüben bzw. keine Zytotoxizität nachweisbar ist. In keiner Konzentration konnte eine LD-50 nachgewiesen werden. Es hat eher den Anschein, dass die Eiweißfraktionen leicht proliferierend wirken (ca. 8 %).

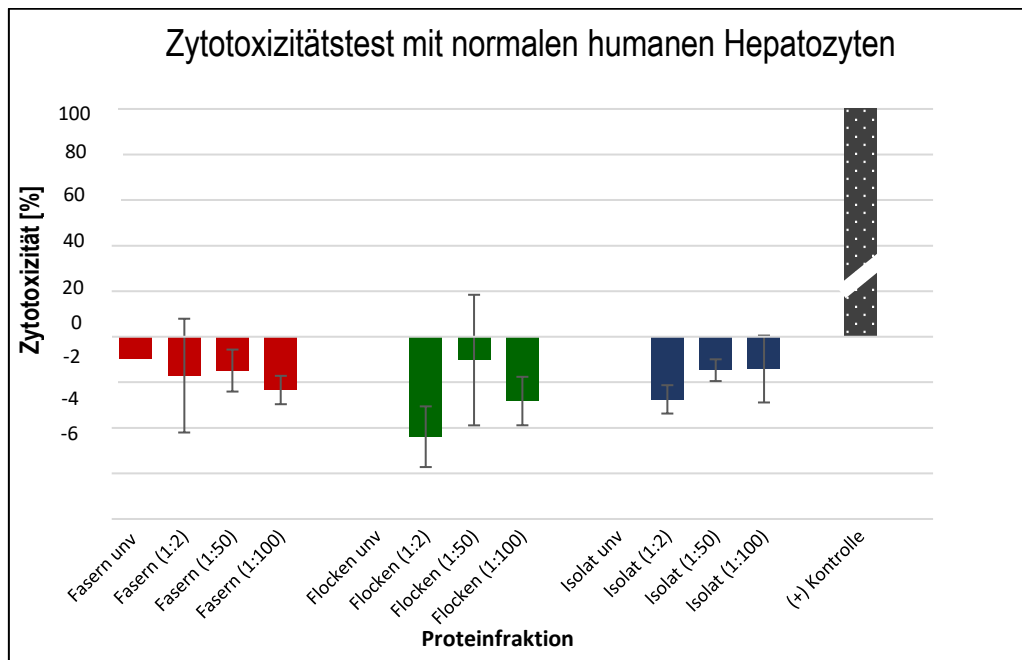


Abb. 35: Zytotoxizitätstest mit humanen Leberzellen. Darstellung der relativen Zytotoxizität [%] als Mittelwerte mit Standardabweichung. Zytotoxischer Einfluss verschiedener Proteinkonzentrationen aus den Lupinenfasern (rot), Lupinenflocken (grün) und dem Lupinenisolat (blau) auf Hepatozyten. (+) Kontrolle: Triton; unverdünntes Fasern, Flocken und Isolate sowie jeweils unterschiedlichen Konzentrationen von 1:2, 1:50, 1:100 Protein:Ratio.

Dem Mangel an Material geschuldet hat diese einmalige Untersuchung wenig Aussagekraft. Die Daten konnten nicht in weiteren Untersuchungen validiert werden und sind nicht als signifikant anzusehen. Die Untersuchungen auf die Bildung der Metabolite Albumin und Harnstoff konnten aufgrund des Materials von nur einem Patienten lediglich in einer Versuchsreihe erfolgen. Da diese Einzeluntersuchung keine verwertbaren Aussagen zulässt, wird sie hier keine gesonderte Erwähnung finden.

5 Diskussion

Der Fokus dieses Projektes lag auf der Charakterisierung der Allergene und der Senkung des allergenen Potenzials von Proteinisolaten der Blauen Süßlupine (*Lupinus angustifolius*) unter Laborbedingungen. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem die Allergenität der Lupineneiweiße reduziert wird, ohne dass ein Qualitätsverlust entsteht.

5.1 Allergen Charakterisierung und Identifizierung

Foley et al., haben 2011 auf molekularer Ebene die Speicherproteine der *Lupinus angustifolius* isoliert und sequenziert. Sie haben insgesamt 16 Mitglieder der Conglutinfamilie identifiziert. 11 davon wurden vorher noch nicht beschrieben. Sie haben 2 α , 5 β , 1 γ und 3 δ Conglutinsequenzen neu identifiziert. Basierend auf der Transkriptionsebene war die häufigste Conglutin Familie β (56 %), gefolgt von α (24 %), γ (15 %) und δ (6 %).

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Mikkat vom Proteom Zentrum Rostock war es möglich die Charakterisierung und Identifizierung der Lupinenproteine aus dem Lupinenmehl durchzuführen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Conglutin Familie wie folgend charakterisiert und identifiziert werden: Conglutin β (71 %), gefolgt von α (26 %), γ (1 %) und δ (2 %). Die Untersuchungen von Foley et al. bestätigen das Ergebnis dieser vorliegenden Arbeit. Die Unterscheidung der verschiedenen Isoformen von Conglutin β war nur eingeschränkt möglich. Insbesondere die Isoformen β 2, 3, 6 und 4 konnten nur bedingt durch Peptide Mass Fingerprinting unterschieden werden. Wahrscheinlich verteilen sich die abundanten Isoformen (besonders Conglutin β 5 und Conglutin β 1) über das gesamte Gel. Eventuell liegen viele verschiedene Fragmente dieser Proteine vor. Trotzdem unterstützen die MS/MS-Messungen, die durchgeführten Ergebnisse.

Eine große Hürde war die Anschaffung von Lupinenallergikerserum, das sehr schwer zu beschaffen war, da zurzeit nur wenige Personen in Deutschland allergisch reagieren. In Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. Maren Hoene (Fachärztin für Dermatologie Rostock) und Herrn Dr. med. Christoph Kreiker (Facharzt für Innere Medizin, Pneumologie Lüneburg) und der Serenbank D-Lab Hamburg wurden 13 Patienten mit Hinweis auf eine Sensibilisierung gegen Lupinen, Erdnuss und Soja rekrutiert. Alle diese Patienten haben auf mindestens zwei der Leguminosen stark reagiert.

Aus Abb. 10 und Tab. 8 wird deutlich, dass die verschiedenen Allergene der Blauen Süßlupine von den Einzelseren in Bezug auf ihre Häufigkeit und Intensität unterschiedlich stark detektiert werden. Der Vergleich der Ergebnisse aus 4.1 zeigt, dass Seren mit einem hohen spezifischen IgE-Gehalt (siehe EAST-Klassifizierung) auch eine starke Allergendetektion in der Einzelserenbestimmung im Immunoblot aufweisen.

Wichtige Kriterien zur Charakterisierung von Allergenen stellen die MG der einzelnen IgE-bindenden Proteine, sowie deren Detektionshäufigkeit dar. Diese Kennzeichen ergeben sich anhand der Detektion der Allergenspektren nach SDS-PAGE/Semidry-Blotting und anschließender Immunfärbung mit Einzelseren gegen Lupinen, Soja bzw. Erdnuss allergischer Patienten. Durch die verwendeten 13 Einzelseren konnten insgesamt ca. 20 Lupinenallergene im MG-Bereich > 20 kDa bis 100 kDa identifiziert werden. Der Serumpool weist Banden von 100 bis 25 kDa auf. Unterschiedliche Studien [4, 99, 156] belegen, dass die meisten Lebensmittelallergene MG zwischen 10 und 70 kDa, selten bis zu 100 kDa, aufweisen. Dieser Bereich gewährleistet den Erhalt einer Immunogenität und Durchlässigkeit gegenüber der intestinalen Mucosa [215]. Somit liegen Übereinstimmungen mit den ermittelten Untersuchungsergebnissen vor.

Andererseits werden die Allergene im Immunoblot mit MG von 20, 40 und 75 kDa von mindestens 54 % der Patienten detektiert, sodass sie den Kriterien zur Klassifizierung als Majorallergen Conglutin α (spezifisch $\alpha 1$, $\alpha 2$) und β (spezifisch $\beta 1$ und $\beta 5$) entsprechen.

Im niedermolekularen Bereich < 14 kDa liegen keine Allergene vor. Vergleichende Betrachtungen ermöglichen eine Zuordnung von stark detektierten Banden mit MG von 20, 25, 40 und 75 kDa sowie schwächer angefärbten Banden bei 15, 30, 37, 50, und 70 kDa. Verglichen mit der Studie von Moneret-Vautrin et al., ergeben sich insbesondere im niedermolekularen Bereich große Übereinstimmungen zu dem in der vorliegenden Arbeit detektiertem Allergenspektrum. Insgesamt 4 der identifizierten Allergene konnten, abgesehen von analytisch bedingten geringen Abweichungen der MG, in beiden Studien nachgewiesen werden [52].

Conglutin α

Lupin Globuline sind immunogen. Conglutin α ist ein potentiell Allergen [39, 59]. Dooper et al. (2007) machten die ersten Untersuchungen, die die Nutzung von monoklonalen Antikörper gegen Lupineallergene beschreiben. Er bestätigte dessen Allergenität mit der Beobachtung, dass Seren aus Lupinenallergikern ausgeprägte IgE-Bindung zu Conglutin α zeigen. Das unterstützt den vorherigen Vorschlag von Magni et al., dass das Conglutin α ein Allergen der Lupine ist. Diese Studie bestätigt einen Prozentsatz von 31 %.

Conglutin β

Goggin et al. (2008) beschreiben ein ausgeprägtes Allergenspektrum im MG-Bereich von 49 bis 90 kDa. Basierend auf massenspektrometrischer Analyse von IgE-reaktiven Proteinspots auf 2D-Gelen und der IgE spezifischen Reaktivität von gereinigtem Conglutin B aus *L. angustifolius* hat ihre Studie [59] Conglutin β als Allergen in *L. angustifolius* und *L. albus* identifiziert. Diese Analyse legt nahe, dass Conglutin β ein Hauptallergen der *L. angustifolius* ist, da das IgE aus allen Lupinenallergikern dieses Protein erkennen und binden konnte. Dieses Allergen aus der *L. angustifolius* wurde von der

International Union of Immunological Societies (IUIS) als Lup an 1.0101 bezeichnet. Conglutin β , das Hauptspeicherprotein in der von uns untersuchten Lupine, ist ein 7S Globulin *vicilin like* und hat eine signifikante Sequenzidentität mit Ara h 1 der Erdnuss. Hier konnte eine Konzentration von 71 % nachgewiesen werden.

Conglutin γ

In einer weiteren Studie konnten Klos et al. (2010) IgE-bindende Proteine mit einem MG von 40 kDa und 90 kDa nachweisen, wobei Conglutin γ und die kleine Untereinheit von Conglutin γ identifiziert werden konnten. Die erhaltenen Daten stimmen mit vorherigen Ergebnissen über die Allergenität der weißen Lupine (*L. albus*) überein. Conglutin γ wurde als ein potenzielles Allergen der Lupine identifiziert [106].

Die Allergenität von *L. angustifolius* Conglutin γ wurde ebenfalls von Holden et. al. angedeutet [76]. Die Ergebnisse der Studie von Klos et al. zeigen, dass das Conglutin γ aus der *Lupinus angustifolius* spezifische IgEs von Lupinenallergikern bindet. Dies bestätigt, es sich um eines der Lupinenallergene der *L. angustifolius*. In unserer Arbeit konnte vom Conglutin γ nur das C-Terminal identifiziert werden.

Conglutin δ

Conglutin δ , das zur 2S – Protein – Familie gehört, die oft als Hauptallergen bezeichnet wird [121], ergab keine signifikante immunologische Reaktivität in den bisher durchgeführten Test. In dieser Arbeit konnten von Conglutin δ nur 2 von 62 Spots zugeordnet werden. Das bestätigen die Ergebnisse von Magni et al. (2005) und Goggin et al. (2008) die selbst in der reinen Form des Conglutin δ keine immunologische Reaktivität identifizierten. Mit unserer Studie konnte eine Konzentration von 2 % nachgewiesen werden. Die Allergenität dieses Protein musste nochmal mit Patientenserum höhere IgE gehalt überprüft werden um eine Klasifizierung zu geben.

5.2 Kreuzreaktionen mit anderen Leguminosen

Lupinen- und Erdnussallergiker können auf verschiedene Proteine reagieren.[52]. Basierend auf einer früheren Studie [59] mit beschränkten Lupinensequenzen, könnte das Hauptallergen Conglutin β in der Lupine, nicht in anderen Leguminosen vorkommen [59]. Die Ergebnisse von Foley et al. (2011) aus einer Analyse von 16 Blau Lupinen-Conglutinfamilien bestätigen diese frühere Studie und erweitern die Erkenntnisse, dass alle Mitglieder der β Conglutinfamilie potenzielle Allergene sind, während Mitglieder von anderen Conglutinfamilien unwahrscheinlich zu Lupinen spezifischer Allergenität beitragen. Zu diesem Zeitpunkt war unklar, ob es sich um ein einfaches allgemeines Epitop handelt, das für diese Form der Allergenität verantwortlich ist oder ob es mehrere Epitope gibt. Es scheint jedoch so, dass die verschiedenen Formen von Conglutin β sich einige allgemeine

Epitope teilen. Wenn die Epitope, die allergische Reaktion gegenüber Conglutin β verursachen, identifiziert werden, ist es möglich eine Züchtung von Sorten mit reduzierten Allergenen zu etablieren. Techniken mittels der RNA-Interference (RNAi), die Allergengene in der Erdnuss und Tomate ins Visier nehmen, zeigen bereits ermutigende Ergebnisse [160].

In den letzten Jahren haben Berichte über Lupinenallergien durch primäre Sensibilisierung als verstecktes Allergen oder durch Kreuzreaktionen mit anderen Hülsenfrüchten, besonders mit Erdnuss, zugenommen [37, 40, 48, 60, 137, 142, 166]. Eine große europäische Studie [54] hat gezeigt, dass eine allergische Kreuzreaktivität der Lupine mit Erdnuss rund 15 % der Kinder und Erwachsenen betraf.

Die Studie von Ballabio et al. (2013) bestätigte *in vitro* und *in vivo*, dass das Conglutin β als Lupinenhauptallergen in einer Population von 12 italienischen Erdnussallergikerkindern wirkt. Die Rolle von Conglutin α in der Kreuzreaktivität zwischen Lupinen- und Erdnussproteinen scheint vor allem an der basischen Untereinheit zu liegen, welche eine hohe Homologie zu dem Arachin Polypeptid besitzt. Die Aktivität von Conglutin γ in der Kreuzreaktivität zwischen Lupine und Erdnussproteinen war relevant, trotz der beobachteten Unspezifität der Immunoblot Expression. Conglutin δ scheint keine wichtige Rolle bei der Kreuzreaktivität zwischen Lupine und Erdnuss zu spielen. Solche Ergebnisse wurden erstmals 1999 von Moneret-Vautrin et al. Beschrieben. In Ihren Aufzeichnungen zeigten sie, dass das Hauptallergen der Lupinen auch in der Erdnuss vorhanden ist. Da Vergleichsstudien zu Allergenspektren der Lupinen mittels EAST-Inhibition und *in silico*-Teste bisher fehlen, jedoch starke Ähnlichkeiten in der Proteinzusammensetzung zu den Leguminosen Erdnuss und Soja vorliegen, erfolgte in dieser Arbeit ein zusätzlicher Vergleich mit Proteinspektren im *in silico*-Test. Im Ergebnis konnte die Kreuzreaktivität zwischen Leguminosen bestätigen werden. Laut verschiedener Studien konnten in der Sojabohne bisher zwölf Allergene identifiziert werden [8, 27, 167], wobei die IgE-Bindungen bei Immunoblot-Untersuchungen vor allem zwischen 30 und 70 kDa mit dominierenden starken Banden bei 30 und 50 kDa auftreten [23]. In der Erdnuss wurden insgesamt 17 verschiedene Allergene identifiziert [25, 46, 86, 127, 178]. Auch diese Studien zeigen Übereinstimmungen, dass die Hauptreaktivitäten neben dem 17 kDa-Hauptallergen Ara h 2, auch durch Allergene im MG-Bereich von 30 bis 66 kDa, in dem u.a. auch die Hauptallergene Ara h 1 (64 kDa) und Ara h 3 (57 kDa) lokalisiert sind, stattfinden.

Mit dieser Arbeit konnte durch *in silico*-Untersuchung sowie mit Immunoblot eine ca. 45 %ige Homologie der Proteinsequenzen der Lupinen mit Soja festgestellt werden. Im Immunoblot zeigten sich die unterschiedlichen stark ausgeprägten Banden zwischen 75 und 20 kDa (besonders ausgeprägt bei 30 kDa). Damit liegen Übereinstimmungen bezüglich der detektierten Anzahl sowie dem MG-Bereich der Hauptreaktivitäten der Allergene vor. Darüber hinaus konnte mittels *in silico*-

Test auch eine Homologie mit Linsen festgestellt werden. Allerdings zeigte sich im EAST-Inhibition-Test keine Kreuzreaktivität. Möglicherweise lag dies an der nicht ausreichend zur Verfügung stehenden Menge an Linsenallergikerserum mit hoher IgE-Konzentration.

Das Bandenmuster mittels SDS-PAGE, in dieser Arbeit, zeigt 32 verschiedene Proteinbanden, mit deutlichen Intensitätsunterschiede im MG-Bereich von etwa 9 kDa bis ca. 80 kDa. Besonders intensive Banden sind in den Bereichen von ca. 60 kDa, 20-25 kDa, 30-35 kDa sowie 10 kDa zu erkennen. Zusammenfassend zeigen frühere Studien [79, 133] Übereinstimmungen mit dieser Arbeit, sowohl bezüglich der Anzahl der detektierten Allergene, als auch hinsichtlich der dominierenden Banden zu den vorliegenden Untersuchungsergebnissen der Lupinen-Allergenspektren.

Erdnuss wird als das gefährlichste Leguminosenallergen angesehen und ist am besten in Bezug auf die Allergenität untersucht [52]. Jede der drei Haupterdnuss-Allergene hat eine Homologie zu Lupinenconglutinen. So ist Conglutin α verwandt mit Ara h3 [147], Conglutin β mit Ara h1 [23] und Conglutin δ mit Ara h2 [186] und kann als Leguminoseallergen eingestuft werden. Zusätzlich hat jedes Protein das Potenzial, mehrere allergene Stellen zu besitzen, beispielsweise enthält Ara h3 acht verschiedene Epitope, wobei die meisten davon aus unterschiedlichen Regionen anderer Leguminose-Allergene stammen [151]. Die molekulare Charakterisierung einzelner Allergene stellt nach zuvor erfolgter Isolierung die Grundlage zur verbesserten Diagnostik bzw. Therapie einer LMA dar. Mit zunehmender Exposition der Bevölkerung gegenüber Lupinenmehl (Zöliakiepatienten und andere Gruppen) ist auch in Deutschland das Auftreten von Allergien gegen Lupinenproteine zu erwarten. Gemäß Richtlinie 2006/142/EG vom 22. Dezember 2006 besteht eine besondere Kennzeichnungspflicht bei Verwendung von Lupinen und Lupinenerzeugnissen als Zutat zu Lebensmitteln. Wegen des besonderen allergenen Potenzials fällt die Lupine unter die EU-Kennzeichnungspflicht für Allergene.

5.3 Einfluss technologischer Verfahren

Hitze/ Hochdruck

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Lupinenproteine nachweislich hitzestabile Allergene enthalten. Verarbeitungsverfahren, wie Autoklavieren und Erhitzen im Trockensterilisator, führen nur zu einer minimalen Änderung des Proteinprofils der Blauen Süßlupine. Dabei besitzen die Allergene zahlreicher tierischer, aber auch pflanzlicher Lebensmittel eine hohe Hitzestabilität [182]. Gemeinsam haben diese Allergene eine gute Wasserlöslichkeit, eine Speicherfunktion sowie hohe Stabilitäten gegenüber anderen technologischen Einflüssen [185]. Jedoch eine Studie, in der Lupinensamen gekocht, erhitzt und autoklaviert wurden, hat gezeigt, dass durch diese Verfahrenstechniken eine minimale Änderung auf dem SDS-PAGE Proteinprofil erreicht wird.

Lediglich das Autoklavieren bei 138 °C hatte einen ausschlaggebenden Einfluss auf die Integrität und die Struktur der Lupinenproteine [2]. Die Arbeitsgruppen von Cuadrado et al. (2011) und Guillamón et al. (2008) untersuchten die Auswirkungen von Hitze-Hochdruckbehandlungen wie Instant Controlled Pressure Drop (DIC^R) auf Erdnüsse, Linsen, Kichererbsen, Sojabohnen und Lupinen (*Lupinus albus*). Mit den Ergebnissen, dass durch die DIC Behandlung eine Reduktion der *in vitro* IgE-Bindung von Erdnuss, Linse, Kichererbse und Lupine sowie eine drastische Reduzierung der Sojabohnen-Immunreaktivität erzeugt wird. Die DIC Behandlung entwickelte keine Änderung auf den Gesamtproteingehalt von Körnerleguminosen [33, 62]. Diese Aussage korreliert mit anderen physikalischen Verfahren wie z. B. die Verwendung eines höheren Dampfdruckes und die Veränderung der Behandlungszeiten. Die Immunreaktivität von Sojaproteinen wurde nach der Behandlung bei 6 bar für 3 min fast vollständig eliminiert. Neoallergene nach der Lagerung und Hitzebehandlung wurden in anderen Pflanzenarten, wie Sojabohne [32] und Pekannuss [109] schon beschrieben. Die fortlaufende Entstehung verschiedener allergener Komponenten veranschaulicht die Komplexität der chemischen Modifikationen, die durch die thermische Verarbeitung verursacht wird. Diese Änderungen umfassen die Erzeugung von Maillard Produkten und anderen kovalenten Modifikationen von Proteinen, wie Reaktionen mit oxidierten Lipide, Oxidation durch reaktive Sauerstoffzwischenprodukte, Disulfidbrücken-störung, und Desaminierung von Asparagin [34, 110]. Beyer et al. stellten dar, dass das Frittieren (120 °C, 5 - 10 min) und das Sieden (100 °C, 20 min) von Erdnüssen eine Reduzierung in der IgE-Bindung der wichtigsten Erdnussallergene Ara h 1, Ara h 2 und Ara h 3 verglichen mit Trockenbrennen (dry roasting) (170 °C, 20 min) verursacht. Burks et al. (1992) detektierten keine signifikante Abnahme der Bindung der IgE RAST Inhibition nach Erhitzen (100 °C, bis zu 60 min) von Sojaproteinextrakten. Jedoch scheint das Sieden für 120 min und Mikrowellenerhitzung (700 W, 25 min) von Sojabohnen die Allergenität zu verringern, da nur bei der Hälfte der Soja-Allergie-Patienten spezifische IgE gegen hitzebehandelte Sojabohnenprotein nachgewiesen werden konnte [167]. Wiederum produzierte das Kochen (100 °C, 15 min) von Linsensamen erhebliche Veränderungen in dem elektrophoretischen Muster [158], mit einer starken Zunahme der Allergenität, wie die ELISA Inhibition zeigte [79].

Neben den tierischen Allergenen aus Eiern und Milch besitzen auch die Allergene der Leguminosen Erdnuss und Soja [176] sehr hohe Hitzestabilitäten. Nach Kreft et al. (1995) werden Allergene mit Sequenzepitopen durch thermische Behandlungen nicht beeinflusst, wohingegen Konformationsepitope durch Entfaltung der Peptidketten sowie Aufbrechen der Disulfidbrücken zerstört werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine signifikante Reduzierung des Proteingehalts in der autoklavierten Probe und in der Hitzebehandlung im Trockensterilisator. Es konnte keine

Verminderung der Allergenität und Denaturierung der Lupinenproteine - auch nicht nach 30 min bei einer Temperatur von 200 °C - festgestellt werden. Dies könnte daran liegen, dass das Lupinenmehlisolat aus 91,5 % Protein besteht und dieses sehr stabil ist. Eine andere Ursache könnte sein, dass bei der Hitzebehandlung Neoallergene entstanden sind, da im Immunoblot stark ausgeprägte Banden nachweisbar waren.

Harnstoffbehandlung

Harnstoff (6 M) ist in der Lage, einige Proteine wie z.B. Eiklarproteine in eine globuläre, teilweise denaturierte Form umzusetzen, wobei die ursprungsähnliche Struktur weitgehend erhalten bleibt. Bei einer Studie von Mine und Zhang (2002) zeigt die Harnstoffbehandlung keine Auswirkungen auf die IgE-Bindungsaktivitäten von Ovalbumin und Ovomuroid, während sich bei Conalbumin und Lysozym erheblich höhere Bindungsaktivitäten zu humanen IgE ergaben [152]. In der Dissertation von Sabine Gremmel wurde festgestellt, dass die Extraktionen bei einer Harnstoffbehandlung ein allergenes Potenzial aufwiesen, dass mit dem der Kontrolle übereinstimmte. Jedoch wies die Extraktion aus dem Vollei eine 65fache Verminderung des allergenen Potenzials, im Vergleich zur Kontrolle, auf [118, 152].

Mit der Harnstoffbehandlung an den Lupinenproteinen kann sehr gut gezeigt werden, dass es nicht möglich ist, eine Reduzierung der Allergenität zu erreichen. Aufgrund der stark ausgeprägten Banden in Immunoblot, kann davon ausgegangen werden, dass sich diese Methode höchstwahrscheinlich nicht eignet um die stabilen Proteine der *Lupinus angustifolius* zu denaturieren.

Reduktion/Alkylierung

Die Beseitigung von intramolekularen Disulfidbindungen ist eine geeignete Strategie zur Proteinentfaltung und der Verminderung der Allergenität für Allergene die Konformations-epitopen enthalten. Zum Beispiel zeigte das Hauptmilbenallergen, welches mit der Reduktion und Alkylierung behandelt wurde, eine reduzierte Allergenität, nach dem die Disulfidbindungen von drei auf zwei Bindungen reduziert wurden [93, 198]. Hypoallergenen Mutanten von unspezifischen Lipidtransfer – Proteine (nsLTP) wie beispielsweise die *Parietaria* Spezies mit dem Pollenallergen Par j 1, wurden durch das Aufbrechen von Disulfidbrücken mittels Mutagenese erzeugt [17, 18, 129]. Das Pfirsichallergen Pru p 3, ein Mitglied der Familie nsLTP gekennzeichnet durch 4 hoch konservierte intramolekulare Disulfidbrücken, ist das Hauptallergen für Patienten mit einer Pfirsichallergie im Mittelmeerraum [134, 153]. Eine Primärsensibilisierung für Pru p 3 und eine nachfolgende IgE Kreuzreaktivität mit anderen Mitgliedern der Familie nsLTP gelten als verantwortlich für die Manifestation klinischer Kreuzreaktivitäten in Lebensmitteln und bestimmter Pollenallergien [68, 200]. Die Arbeit von Toda et al. erreichte die Zerstörung der Disulfidbrücken des Pfirsichallergens

Pru p 3 mittels Reduktion und Alkylierung (R/A). Pru p 3 bestätigte eine reduzierte Molekülmasse von 6 kDa im Gegensatz zu der nativen Form des Pflanzallergens nPru p 3 (9 kDa) auf einer SDS – PAGE. In dieser Studie konnte festgestellt werden, dass die Zerstörung der Proteinstruktur des Pflanzallergens nsLTP Pru p 3 signifikant die Verdauungsstabilität, Antigenität und Allergenität reduzierte. Jedoch behielt es die T-Zell-stimulatorische Kapazität des Allergens in Proben von sensibilisierten Personen. Es ist wohlbekannt, dass die Hydrophilie, Flexibilität, Sekundär- und Tertiärstrukturen einen Einfluss auf die Antigenität von Proteinen ausüben [36]. Hier erreicht die Störung der intramolekularen Disulfidbrücken von Pru p 3 einen Verlust der Sekundär- und Tertiärstrukturen.

Die vielen und intensiven Banden im Immunoblot zeigen, dass die in dieser Arbeit bei der Blauen Lupine durchgeführte Reduktion und Alkylierung zu keiner Reduzierung der Allergenität führt. Höchstwahrscheinlich reicht die Störung der Disulfidbindungen nicht aus, um eine signifikante Reduktion der Allergenität zu erreichen, was auf die stabilen Proteine der *Lupinus angustifolius* zurückzuführen ist. Es kann sogar beobachtet werden, dass nach der Reduktion und Alkylierung intensivere Banden zu finden sind, was eher auf eine Steigerung der Allergenität schließen lässt. Dies wäre näher zu untersuchen. Bei diesen und ähnlichen Reaktionen ist neben der Zerstörung oder Blockierung allergener Epitope auch eine Neubildung möglich. In diesem Fall wird eine Steigerung der Intensität der IgE-Bindung deutlich.

Aktivkohle-Behandlung

Von allen löslichen Proteinen aus dem Lupinenextrakt konnte mittels Proteingehaltsbestimmung und Immunoblot festgestellt werden, dass bei mehr als einen 60-fachen Überschuss an Aktivkohle (AC), diese Proteine von der AC vollständig adsorbiert werden. Die Proteine waren nach 5 min vollständig adsorbiert. Für die hier beschriebenen Experimente wurde eine 100 mM NaCl-Konzentration verwendet, um die physiologischen Bedingungen zu simulieren. Ab einer 40:1 AC:Protein Ratio, waren keine Proteinbanden mehr in der SDS – PAGE nachweisbar. Das führt zu der Schlussfolgerung, dass die benötigte Menge an AC für die SDS-PAGE geringer ist, als in der Proteinbestimmung. Wahrscheinlich ist die Methode sehr empfindlich und kann nur sehr kleine Mengen an Proteinen identifizieren. Für den Immunoblot wurden die 10:1 und 40:1 AC:Protein Ratios ausgewählt. Beide zeigten gleiche Bandenmuster wie die vom unbehandelten Lupinenmehl. Ein Unterschied bestand darin, dass die Banden bei ca. 90 kDa im Immunoblot etwas stärker ausgeprägt waren als die in der Kontrolle. Hinzu kommt, dass trotz der AC, die die Proteine adsorbieren, eine starke IgE – Bindung sichtbar war bzw. es konnte eine allergische Reaktion festgestellt werden.

Tanninebehandlung

Aufgrund seiner Fähigkeit zur Bindung unlöslicher Proteinkomplexe, hat die Tanninsäure (TA) große Wirkung bei der Beseitigung der Milbenallergene und Katzenallergene im Hausstaub [194] sowie bei der Desensibilisierung bei Menschen mit Allergien gegen Pollen [125]. Tanninsäure hat eine höhere Affinität zu Proteinen, daher wäre es möglich, die Lupinenproteine an Tanninsäure zu binden. Demzufolge würde die Allergieausbildung reduziert. Insbesondere prolinreiche Proteine [104], welche in signifikanten Mengen in Hülsenfrüchten und Samen [45] existieren. Chung et al. postulierte, dass Komplexe von Tanninsäure-Erdnuss-Allergen Wechselwirkungen unter sauren und alkalischen Bedingungen (dh, pH 2 und 8, die den Magen-Darm pH simulieren) stabil wären und die Allergene nicht freigegeben würden.

Die EAST-Inhibition Daten dieser Arbeit belegen, dass die Behandlung der Lupine mit Tanninsäure bei allen Konzentrationen (0,25, 0,50, 1,0 2,0 mg/ml) zu keiner Veränderung der Allergenität führt. Sie bleibt bei ca .80 %. Der Immunoblot zeigte allerdings eine starke Verminderung der IgE-Bindung bei der 1,0 mg/ml Konzentration, weil kovalente Vernetzungen zwischen Tanninsäure und Proteine ebenfalls möglich sind.

5.4 Untersuchung zur Stabilität der Lupinenproteine und dessen allergenen Potenzial

Bei der allergologischen Analyse von Proteinen sind Stabilitätsuntersuchungen durchzuführen. Diese Untersuchungen beinhalten Analysen der Stabilität des Proteins gegen Verdauungsenzyme und gegen Prozessierung, wie Hitzeeinwirkung. Die Fähigkeit von Lebensmittelallergenen die Mucosamembran des Intestinaltraktes zu erreichen und zu passieren ist eine Grundvoraussetzung für ihre Allergenität. Intakte Proteine sind potenziell in der Lage, die Mucosamembran des Darms zu passieren und in das zirkulierende Blutsystem einzudringen [115, 214]. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen zur Mucosamembran zu gelangen, sollte ein Protein sehr stabil gegenüber den proteolytischen und sauren Bedingungen des Verdauungstraktes sein [115, 214]. Es besteht eine Korrelation zwischen der Stabilität von Proteinen gegenüber dem Verdau und dem allergenen Potenzial. Viele Allergene zeigen eine mehr als zweiminütige Stabilität gegen den Verdau in simulierter gastrischer Flüssigkeit [214]. Einige Hauptallergene sind sogar für mehr als eine Stunde in nachweisbaren Mengen stabil in SGF. Gewöhnliche Lebensmittelproteine hingegen werden unter gleichen Versuchsbedingungen in weniger als 15 sec abgebaut [115]. Aber auch eine Reihe von Allergenen aus Obst, Gemüse, Meeresfrüchten, Milch, Ei, Soja und Erdnuss zeigen keine Resistenz gegen den Verdau in *in vitro*-Assays [53, 86, 214]. Auch Untersuchungen von Fu et al. (2002) zeigten, dass die Korrelation zwischen allergenem Potenzial von Proteinen und ihrer Stabilität gegen den Verdau nicht absolut ist.

Durch die FAO/WHO (2001) sind Methoden zur Stabilitätsanalyse gegen das Verdauungsenzym Pepsin beschrieben. Danach sollte das Protein im Vergleich mit nicht- und allergenen Proteinen zur Analyse herangezogen werden. Nach definierten Zeitpunkten sollten Proben des Protein/Pepsin-Ansatzes entnommen, neutralisiert und mittels SDS-PAGE und anschließend Immunoblot mit polyklonalen-Antikörpern untersucht werden.

Pepsin baut unter diesen Bedingungen nicht nur das allergene Protein, sondern auch alle weiteren Proteine ab [214]. So kann *in vitro* die Abbaukinetik der Lupinenproteine analysiert werden. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit EAST-Inhibition Systemen unter Verwendung von Antikörpern. Ein Vorteil der Verwendung von ELISA-Assays gegenüber einer SDS-PAGE zum Nachweis immunogenen Proteins bzw. Protein-Abbauprodukten (Peptiden) besteht in der Möglichkeit der quantitativen Darstellung der Abbaukinetik der Proteine. Die Ergebnisse der durchgeführten *in vitro* Untersuchungen zur Stabilität der Lupinenproteine gegen den Verdau durch das Enzym Pepsin und Trypsin zeigten, dass es zum Abbau der Lupinenproteine kommt. Beispielsweise waren die Proteine nach 5 bzw. 15 min noch nachweisbar. Das Lupinenprotein in den Proben des Pflanzenmaterials war bis zu 30 min detektierbar. Pepsin muss eine größere Menge an Gesamtprotein verdauen und ist langsamer im Abbau des Proteingemisches [214]. Daraus folgt, dass nicht nur die aufgereinigten Proteine auf ihre Stabilität untersucht werden müssen, sondern auch das komplette Pflanzenmaterial [214]. Es konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Proteine durch die Verdauungsenzyme Pepsin und Trypsin abgebaut werden. Dieser Abbau erfolgte bei Vorhandensein der Lebensmittelmatrix langsam. Daraus lässt sich ableiten, dass das Verhältnis von Pepsidase zu TSP (total soluble protein, dem gesamtlöslichem Protein) eine zentrale Komponente darstellt. Das TSP entscheidet, wie schnell ein Protein abgebaut wird. Zur Vergleichbarkeit der Resultate müsste diese Methode mit Lebensmitteln, die Lupinenproteine enthalten und auch mit Lebensmitteln, die bereits bekannten Allergene beinhalten, sowie mit den aufgereinigten Allergenen durchgeführt werden. Die Stabilitätsprüfung der Proteine unter Verwendung des Verdauungsenzyms Pepsin ist ein brauchbarer Bewertungsansatz der Allergenitätsprüfung. Beispielsweise ließe sich *in vitro* auch das basische Milieu des Dünndarms mit den entsprechenden Verdauungsenzymen nachstellen. Weiterhin könnte ein bakterieller Verdau ergänzt werden.

Sormus de Castro Pinto et al. (2009) untersuchten die Wirkungen der enzymatischen Behandlung von Pepsin und Trypsin *in vitro* auf die immunologische Reaktivität der wichtigsten Globuline von Süßlupinen, Kichererbsen und Linsen. Die Globuline wurden mit Pepsin und Trypsin für 1, 5, 15 und 30 min hydrolysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die enzymatische Behandlung des Hauptspeicherproteins (11S-Globulin) süßer Lupinen, Kichererbsen und Linsen mit Pepsin oder Trypsin zur Bildung großer Mengen von kurzen Peptiden und freien Aminosäuren führte, die die

Antikörperbindung im Immunoblot nicht zulassen, was zu einer geschwächten Immunreaktivität führte. Sormus de Castro Pinto hat gezeigt, dass die Proteine von Lupine, Kichererbsen und Linsen ihre antigene Aktivität nach einer Hydrolyse mit Pepsin für 30 min nicht beibehalten haben. Die Daten zeigen, dass das dominante Allergen in der 11S-Globulin von Lupine aus einer Grundeinheit von ca. 20 kDa besteht und es seine Immunreaktivität/Antigen-Aktivität durch Hydrolyse mit Pepsin und Trypsin verliert. In dieser Arbeit konnte im Immunoblot eine AG/AK Bindung beobachtet werden. Die AG/AK Bindung entstand bei einer MG von 30 kDa. Zuvor erfolgte eine Trypsinierung der Allergene. In der EAST-Inhibition war eine Allergenität nachweisbar. Die Arbeitsgruppe von Sormus de Castro Pinto hat die Weisse Lupine (*Lupinus albus*) untersucht. Es ist wahrscheinlich, dass diese Parameter einen Einfluss auf die Unterschiede der Ergebnisse haben, was ebenfalls Gegenstand in dieser Arbeit ist.

5.5 *in silico*-Sequenzanalyse

Eine Homologieanalyse der Aminosäuresequenz des Proteins zu Sequenzen von Proteinen mit bekannter Allergenität erfolgt mittels einer *in silico*-Sequenzanalyse. Dafür stehen Datenbanken zur Verfügung, in denen die Sequenzen aller bekannten bislang sequenzierten Proteine auf Nukleinsäure- bzw. Aminosäureebene hinterlegt sind. In Frage zu stellen ist, ob eine einzelne Datenbank für die Analyse ausreichend ist und ob alle Datenbanken gleiche Ergebnisse erbringen [214].

Die verwendeten Datenbanken (SDAP, EVALLER und AllergenOnline) vergleichen eingegebene Aminosäuresequenzen mit den Sequenzen aller bislang bekannten Allergene und beziehen sich auf Server der Institutionen CBI, NCBI, PIR, BCM und EMBL-EBI [214]. Die genannten Datenbanken lieferten alle die gleichen Ergebnisse in Bezug auf die Homologie der untersuchten Proteine im Vergleich mit bekannten Allergenen. Für die Lupinenproteine wurden lediglich mit der SDAP Datenbank 11 Allergene von jeweils mehr als 6 aufeinanderfolgenden Aminosäuren gefunden. Das sind die Allergene Len c 1 aus der Linse, Gly m 5 aus Soja, Ara h 1 aus der Erdnuss, Vig r 2 aus der Mungobohne, Jug r 2 und Jug n 2 aus der Walnuss, Ses i 3 aus Sesam, Cor a 11 aus der Haselnuss, Pis v 3 aus der Pistazie, Ana o 1 aus Cashew Kernen und Pru du 6 aus der Mandel.

Das Screening mit den weiteren genannten Datenbanken lieferte die gleichen Treffer. Daraus ergibt sich, dass für die *in silico*-Prüfung mehrere Datenbanken herangezogen werden sollten, auch wenn diese teilweise auf die gleichen Server zugreifen [214]. Auch die EFSA rät, verschiedene Suchstrategien basierend auf den verfügbaren Sequenzen in relevanten Datenbanken durchzuführen. Für Lupinenproteine, die zu der Leguminosenfamilie gehören, ist es zu erwarten, dass hier eine große Zahl an Allergenen zu finden ist, mit denen eine mögliche Kreuzreaktion

auftreten kann. Daher wird die Wichtigkeit der Verwendung mehrerer Informationsquellen für die *in silico*-Sequenzanalyse verdeutlicht.

5.6 Zytotoxizitätsuntersuchung

Bei Verwendung der Lupinenproteine in der menschlichen Ernährung ist es besonders wichtig, dass die Inhaltstoffe des Lebensmittels keine toxischen Effekte auf gesunden Zellen des Organismus ausüben.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen liegen keine vergleichbaren Studien mit dem beschriebenen Pflanzenmaterial an humanen Zellkulturlinien vor.

Mit den Hepatozyten wurde ausschließlich der LDH-Test (Abb. 35) durchgeführt. Es hatte sich gezeigt, dass die Lupinenproteine, d.h. Lupinenisolat, Lupinenfasern und Lupinenflocken, keine zytotoxische Wirkung auf diese Zelllinie ausüben. Da dieser Test bei den Hepatozyten allerdings nur einmal durchgeführt wurde, und alle gemessenen Probenüberstände je Konzentration aus jeweils 4 Wells mit Zellen stammten, sollten zukünftig weitere Untersuchungen erfolgen.

5.6.1 Wirkung der Proteinisolate auf die Harnstoff-und Albuminsynthese

Diese Versuche wurden an den Hepatozyten vorgenommen. Nur in Leberzellen findet die Synthese von Harnstoff und Albumin statt. In der Zellkultur spielt Albumin vor allem als Parameter für die Syntheseleistung der Zellen eine Rolle. Albumin ist ein leberspezifischer Parameter für die Proteinbiosynthese und wird aus diesem Grund gern zur Leistungsbeurteilung einer Leber-Zellkultur herangezogen, während die Harnstoffsynthese eher ein Parameter für den Proteinabbau darstellt. Vergleicht man die höchste Proteinkonzentration zwischen Albumin- und Harnstoffsynthese, lässt sich feststellen, dass die relative Albuminsynthese stärker sinkt als die Harnstoffsynthese, was bedeutet, dass immer noch viele abgebaute Proteine weiter zu Harnstoff verarbeitet werden.

Die Bildung der Metabolite Albumin und Harnstoff konnte aufgrund der geringen Zellzahl nur in einer Versuchsreihe untersucht werden. Eine solche Einzeluntersuchung lässt keine verwertbaren Aussagen zu. Für eine Ergebnisdiskussion wären weitere Tests notwendig.

6 Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit konnten Erkenntnisse zur Charakterisierung der Blauen-Lupine-Allergene sowie deren Stabilität und Einfluss auf die Proteinmodifikationen gewonnen werden.

Es ist aufgrund der Ergebnisse lediglich eine Tendenz von Major- und Minorallergenen zu erkennen und weitere Untersuchungen sollten sich anschließen. Durch den enormen Anstieg an Lupinenallergien ist es nötig, die dargestellten Ergebnisse mit einer höheren Probandenanzahl zu überprüfen und das Methodenspektrum zu erweitern.

In Hinblick auf die potenzielle Minimierung der Gesamtallergenität durch thermische Behandlung der untersuchten Blauen Lupine erscheinen weitere Studien nicht notwendig, da durch die dokumentierten Untersuchungen eine hohe Hitzestabilität einzelner Allergene hinreichend nachgewiesen wurde [215].

Wie bei Barkholdt et al. (1998), sollte bei der Blauen Lupine der Einfluss fermentierender Bakterien auf das allergenen Potenzials untersucht werden.

Die Möglichkeiten zur gezielten Abtrennung einzelner Proteinfractionen, wie beispielsweise die der β Conglutin-Familie, scheinen hier nicht sinnvoll zu sein. Diese Proteinfamilie stellt mit einer Konzentration von 71 % den größten Teil des Proteingehalts, infolge einer Abtrennung wäre demnach der Verlust zu groß.

Die *in silico*-Sequenzanalyse von Proteinen mit bekannten Allergenen anhand von Datenbanken, berücksichtigt lediglich die Primärstruktur der Aminosäuresequenz. Diskontinuierliche IgE-Epitope, die aus der Faltung bzw. der 3D-Struktur des Proteins resultieren, werden nicht berücksichtigt. Darüber hinaus sind bislang wenige Informationen über Konformationsepitope verfügbar. Deshalb sollten alle gewonnenen Erkenntnisse über T- und B-Zell-Epitope und das Bindungsverhalten von IgE-Antikörpern an Proteinen in Epitop-Datenbanken einfließen und könnten so zur allergologischen *in silico*-Analyse beitragen.

Die Verfügbarkeit und die Qualität geeigneter Patientenserum für die Untersuchung der IgE-Kreuzreaktivitäten zwischen Proteinen und strukturell ähnlichen Allergenen ist heikel. Serum von Allergikern sind oftmals nicht ausreichend genau charakterisiert. Weiterhin könnte sich die Anzahl der zur Verfügung stehenden Serum und deren Reaktivität als limitierend erweisen. Serumbanken werden nicht zentralisiert, sondern von jeder Institution einzeln geführt. Sinnvoll wäre ein Zusammenschluss von Institutionen, die eine gemeinschaftliche Serumbank zur Verfügung stellen.

7 Literaturverzeichnis

1. Alsohaimy SA, Sitohy MZ, El-Masry RA: Isolation and partial Characterization of Chickpea, Lupine and Lentil Seed Proteins. *World Journal of Agricultural Sciences* 2007. 3(1): 123-129.
2. Álvarez-Álvarez J, Guillamón E, Crespo J, Cuadrado C, Burbano C, Fernández C, Muzquiz M: Effects of Extrusion, Boiling, Autoclaving, and Microwave Heating on Lupine Allergenicity; *J. Agric. Food Chem.* 2005. 53: 1294-1298.
3. Arnoldi A: Nutraceutical properties of white and narrow-leaved lupin. *Lupins for health and wealth Proceedings of the 12th International Lupin Conference, Fremantle, Western Australia, 14-18 September 2008.* 452-454.
4. Aulepp H, Vieths S: Probleme der Nahrungsmittelallergie. *Deutsches Lebensm. Rundsch* 1992. 88: 171-179.
5. Aysenur K, Akan A, Mustafa E, Müge T, Kocabas N: Anaphylaxis induced by lentil inhalation. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2012. 30:167-169.
6. Ballabio C, Penas E, Uberti F, Fiocchi A, Duranti M, Magni C, Restani P: Characterization of the sensitization profile to lupin in peanut-allergic children and assessment of cross-reactivity risk. *Pediatr Allergy Immunol* 2013. 24: 270–275.
7. Barbehenn RV & Constabel CP: Tannins in plant–herbivore interactions. *Phytochemistry* 2011. 72(13): 1551–1565.
8. Baur X, Häberle M, Sauer W, Weiss W: Verborgene Inhalations- und Nahrungsmittel-allergene: Leguminosenproteine. *Prax Klein Pneumol* 1988. 42: 701-704.
9. Beardslee T, Zeece M, Sarath G, Markwell J: Soybean Glycinin G1 Acidic Chain Shares IgE Epitopes with Peanut Allergen Ara h3. *Int Arch Allergy Immunol* 2000. 123: 229-307.
10. Bernhisel-Broadbent J, Dintzis HM, Dintzis RS, Sampson HA: Allergenecity and antigenicity of chicken egg ovomucoid (Gal d 3) compared with ovalbumin (Gal d 1). *J Allergy Clin Immunol* 1994. 93: 1047-1059.
11. Besler M, Steinhart H, Paschke A: Allergenicity of Hen´s Egg-white Proteins: IgE Binding of Native and Deglycosilated Ovomucoid. *Food and Agricultural Immunology* 1997. 9:277-288.
12. Beyer K, Morrow E, Xiu-Min L, Bardina L, Bannon GA, Burks AW, Sampson HA: Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2001. 107; 1077-1081.
13. Bez J, Schott M, Seger A: Application of lupin protein ingredients in muffin, biscuit and extruded snacks. In: *Healthy Pro-Food* 2005.
14. Birk Y: Antinutritional factors in lupins and in other legume seeds: pros and cons. In J. M. Neves-Martin, & M. L. Beirao daCosta (Eds.), *Advances in lupin research* 1993. 424-429. Lisboa: ISA Press.
15. Blagrove RJ, Gillespie JM: Isolation, Purification and Characterization of the Seed Globulins of *Lupinus angustifolius*. *Aust. J. Plant Physiol.* 1975. 2: 13-27.

16. Bohle B, Radakovics A, Jahn-Schmidt B, Hoffmann- Sommergruber K: Bet v 1, the major birch pollen allergen, imitates sensitization to Api g 1, the major allergen in celery: evidence at the T cell level. *Eur. J. Immunol.* 2003. 33: 3303–3310.
17. Bonura A, Amoroso S, Locorotondo G, Di Felice G, Tinghino R, Geraci D, et al: Hypoallergenic variants of the *Parietaria judaica* major allergen Par j 1: a member of the non-specific lipid transfer protein plant family. *Int Arch Allergy Immunol* 2001. 126: 32-40.
18. Bonura A, Corinti S, Artale A, Di Felice G, Amoroso S, Melis M, et al: A hybrid expressing genetically engineered major allergens of the *Parietaria pollen* as a tool for specific allergy vaccination. In *Arch Allergy Immunol* 2007. 142: 274-84.
19. Brandtzaeg PER: Current understanding of gastrointestinal immunoregulation and its relation to food allergy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002. Vol. 964. 13-45.
20. Breiteneder H, Radauer C: A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2004. 113(5):821-30 Review.
21. Bruijnzeel-Koomen C, Ortolani C, Aas K, Bindslev-Jensen C, Björkstén B, Wüthrich B: Adverse reactions to food. Position paper of the European Academy of Allergy and Clin Immunol 1995. 50: 623-635
22. Bundesinstitut für Risikobewertung Stellungnahme Nr. 039/2011 des BfR vom 26. August 2011 Allergie durch Lupineneiweiß in Lebensmitteln.
23. Burks AW, Fuchs RL: Assessment of the endogenous allergens in glyphosate-tolerant and commercial soybean varieties. *J Allergy Clin Immunol* 1995. 96: 1008-1010.
24. Burks AW, Ballmer-Weber BK: Food allergy; *Mol. Nutr. Food Res.* 2006. Vol. 50: 595-603.
25. Burks AW, Williams LW, Connaughton C, Cockrell G, O'Brien T: Identification and characterization of a second major peanut allergen, Ara h II, with the use of the sera of patients with atopic dermatitis and positive challenges. *J Allergy Clin Immunol* 1992a. 90: 962-969.
26. Burks AW, Williams LW, Thresher W, Connaughton C, Cockrell G, Helm RM: Allergenicity of peanut and soybean extracts altered by chemical or thermal denaturation in patients with atopic dermatitis and positive food challenges. *J. Allergy Clin. Immunol* 1992. 90: 889-897.
27. Bush RK, Schroeckenstein D, Meier-Davis S, Balmes J, Rempel D: Soybean flour asthma: detection of allergens by immunoblotting. *J Allergy Clin Immunol* 1988. 82(2): 251-255.
28. Capraro J, Magni C, Faoro F, Maffi D, Scarafoni A, Tedeschi G, Maffioli E, Parolari A, Manzoni C, Lovati MR, M: Internalisation and multiple phosphorylation of γ -Conglutin, the lupin seed glycaemia lowering protein, in HepG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2013. 437: 648-652.
29. Chung S, Reed S: Removing peanut allergens by tannic acid. *Food chemistry* 2012. 134: 1468-147.
30. Cianferoni A, Spergel J: Classification and diagnosis; *Allergology International. Review* 2009. 58: 457-466.

31. Clemente A & Domoney C: Therapeutic properties of legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. *Recent Progress in Medicinal Plants* 2008. 20: 397-417.
32. Codina R, Oehling A G, Lockey R F: Neoallergens in heated soybean hull. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1998. 117: 120-125.
33. Cuadrado C, Cabanillas B, Pedrosa M, Muzquiz M, Haddad J, Allaf K, Rodriguez J, Crespo J, Burbano C: Effect of Instant Controlled Pressure Drop on IgE Antibody Reactivity to Peanut, Lentil, Chickpea and Soybean Proteins. *Int Arch Allergy Immunol* 2011. 156: 397–404.
34. Davis PJ, Smales CM, James DC: How can thermal processing modify the antigenicity of proteins? *Allergy* 2001. 67: 56-60.
35. de Boer J, Helms M, Aiking H: Protein consumption and sustainability: Diet diversity in EU-15. In: *Ecological Economics*, 59. 2006. Nr. 3: 267-274.
36. de Groot AS, McMurry J, Moise L. Prediction of immunogenicity: *in silico* paradigms, ex vivo and in vivo correlates. *Curr Opin Pharmacol.* 2008. 8: 620-6.
37. de Jong NW, van Maren MS, Vlieg-Boerstra BJ, Dubois AEJ, de Groot H, van Wijk G: Sensitization to lupine flour: is it clinically relevant? *Clinical & Experimental Allergy* 2010. 40: 1571-1577.
38. Demmel A, Hupfer C, Hampe E, Busch U, Engel K-H: Development of a Real-Time PCR for the Detection of Lupine DNA (*Lupinus* Species) in Foods. *J. Agric. Food Chem.* 2008. 56: 4328-4332.
39. Dooper M, Holden L, Faeste C, Thompson K, Egaas E: Monoclonal Antibodies against the Candidate Lupin Allergens α -Conglutin and β -Conglutin, *Int Arch Allergy Immunol* 2007. 143:43-58
40. Dooper M, Plassen C, Holden L, Lindvik H, Faeste CK: Immunoglobulin E Cross-Reactivity Between Lupine Conglutins and Peanut Allergens in Serum of Lupine-Allergic Individuals. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 2009. 19(4): 283-291.
41. Duranti M, Consonni A, Magni C, Sessa F, Scarafoni A: The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends in Food Science & Technology* 2008. 19(12):624-633.
42. Duranti M, Restani P, Poniatowska : The seed globulins of *Lupinus albus*. In: *Phytochemistry* 1981. 20 Nr. 9: 2071-2076.
43. EFSA: Guidance Document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the Risk Assessment of Genetically Modified Plants and Derived Food and feed. 2006.
44. EFSA: Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on the use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified plants. In: *The EFSA Journal* (48) 2004: 1_18. (http://www.gmo-compass.org/pdf/documents/efsa_marker.pdf).
45. Eggum BO, Beames RM: The nutritive value of seed proteins. In W.Gottschalk & H. P. Muller (Eds.), *Seed Proteins: Biochemistry, Genetics, Nutritive Value*. The Hague, The Netherlands: Martius Nijhoff/dr W. Junk Publishers 1983. 499–531.
46. Eigenmann PA, Burks AW, Bannon GA, Sampson HA: Identification of unique peanut and soy allergens in sera adsorbed with cross-reacting antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 1996. 98: 969-978.

47. Elsayed S, Stavseng L: Epitope mapping of region 11-70 of ovalbumin (Gal d I) using five synthetics peptides. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1994. 104 (1): 65-71.
48. Faeste C, Løvik M, Wiker H, Egaas E: A Case of Peanut Cross-Allergy to Lupine Flour in a Hot Dog Bread. *Int Arch Allergy Immunol* 2004. 135: 36-39.
49. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization): Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology (22 - 25 January 2001); Rome, Italy.
50. Fechner A, Schweiggert U, Hasenkopf K: Lupine Kernel Fiber: Effects in Human Intervention Studies and Use as a Supplement in Wheat Bread, In: Victor RP Ronald Ross, W. und Vinood, BP: Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention, San Diego: Press 2011. 463-473.
51. Foetisch K, Westphal S, Lauer I, Retzek M, Altmann F, Kolarich D, Scheurer S, Vieths S: Biological activity of IgE specific for cross-reactive carbohydrate determinants. *J Allergy Clin Immunol*. 2003. 889-896.
52. Foley et al: Identification and characterisation of seed storage protein transcripts from *Lupinus angustifolius*, *BMC Plant Biology* 2011. 11:59.
53. Fu TJ: Digestion stability as a criterion for protein allergenicity assessment. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002. Vol. 964: 99-110.
54. Gayraud J, Mairesse M, Fontaine JF, Thillay A, Leduc V, Rancé F, Parisot L, Moneret-Vautrin DA: The prevalence of sensitization to lupin flour in France and Belgium: a prospective study in 5,366 patients, by the Allergy Vigilance Network. *European annals of allergy and clinical immunology* 2009. 41(1): 17-22.
55. Gell PGH, Coombs RRA: *Clinical Aspects of Immunology* 1963. Blackwell Science Ltd.
56. Glaspole IN, de León MP, Prickett S, O'Hehir R, Rolland J: Clinical Allergy to Hazelnut and Peanut: Identification of T Cell Cross-Reactive Allergens. *Int Arch Allergy Immunol* 2011. 155: 345-354.
57. Glencross BD: Feeding lupins to fish: A review of the nutritional and biological value of lupins in aquaculture feeds 2001. Department of Fisheries - Research Division: Grains Research Council (GRC), Australia: Department of Fisheries -Research Division.
58. Glick BR, Pasternak JJ: *Molekulare Biotechnologie*. Spektrum Akademischer Verlag-Heidelberg 1995.
59. Goggin DE, Mir G, Smith WB, Stuckey M, Smith PAC: Proteomic analysis of lupin seed proteins to identify conglutin beta as an allergen, *Lup an 1. Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008. 56(15): 6370-6377.
60. Grundmann SA, Mertens S, Hungeling S, Brehler R: Lupinenmehl-ein Allergen gewinnt an Bedeutung. *Akt Dermatol*. 2008. 34:270-273.
61. Guarneri F, Guarneri C, Benvenga S: Identification of Potentially Cross-Reactive Peanut-Lupine Proteins by Computer-Assisted Search for Amino Acid Sequence Homology; *Int Arch Allergy Immunol*. 2005. 138:273-277.

62. Guillaumón E, Burbano C, Cuadrado C, Muzquiz M, Pedrosa M, Sánchez M, Cabanillas B, Crespo J, Rodríguez J, Haddad J, Allaf K: Effect of an Instantaneous Controlled Pressure Drop on in vitro Allergenicity to lupins (*Lupinus albus* var Multolupa). *Int Arch Allergy Immunol*. 2008. 145: 9-14.
63. Guillaumón E, Burbano C, Cuadrado C, Muzquiz M, Pedrosa M, Sánchez M, Cabanillas B, Crespo, Rodríguez J, Haddad J, Allaf K: Effect of an Instantaneous Controlled Pressure Drop on in vitro Allergenicity to Lupins (*Lupinus albus* var Multolupa). *Int Arch Allergy Immunol*. 2008. 145: 9-14.
64. Guillaumón E, Rodríguez J, Burbano C, Muzquiz M, Pedrosa M, Cabanillas B, Crespo J, Sancho A, Mills EN, Cuadrado C: Characterization of lupin major allergens (*Lupinus albus* L.) *Mol. Nutr. Food Res*. 2010. 54: 1668-1676.
65. Gutiérrez D, Conde A, Duran S: Contact urticaria from lupin. In: *Contact Dermatitis* 36, 1997. Nr. 6: 311-311.
66. Haddad J, Allaf K: Impact of Controlled Instantaneous Pressure Drop (DIC) on Lupin Quality. Proceedings of the 10th International Lupin Conference, June 2002.
67. Hanelt P: Die Lupinen - Zur Botanik und Geschichte landwirtschaftlich wichtiger Lupinenarten, Wittenberg Lutherstadt DDR: A. Ziemsen Verlag 1960.
68. Hartz C, Lauer I, del Mar San Miguel Moncin M, Cistero-Bahima A, Foetisch K, Lidholm J, et al: Comparison of IgE-binding capacity, cross-reactivity and biological potency of allergenic non-specific lipid transfer proteins from peach, cherry and hazelnut. *Int Arch Allergy Immunol*. 2010. 153: 335-46.
69. Hefle SL, Lemanske RF, Bush RK: Adverse reaction to lupine-fortified pasta. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 1994. Nr. 2, Part 1: 167-172.
70. Hefle SL: The chemistry and biology of food allergens. *Food Technol*. 1996. 50: 86- 92.
71. Henzgen M, Vieths S, Reese I, Erdmann S, Fuchs T, Jäger L, Kleine Tebbe J, Niggemann B, Saloga J, Vieluf I, Zuberbier T, Werfel : Nahrungsmittelallergien durch immunologische Kreuzreaktionen. *Allergo J* 2005. 14: 48-59.
72. Henzgen M, Vieths S, Reese I, Erdmann S, Fuchs T, Jäger L, Kleine-Tebbe J, Lepp U, Niggemann B, Saloga J, Vieluf I, Zuberbier T, Werfel T: Nahrungsmittelallergien durch immunologische Kreuzreaktionen, *Allergo J* 2005. 14: 48-59.
73. Hieta N, Hasan T, Mäkinen-Kiljunen S: Lupin allergy and lupin sensitization among patients with suspected food allergy. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 103, 2009. Nr. 3: 233-237.
74. Hildebrandt S, Kratzin H, Schaller R, Fritsche R, Steinhart H, Paschke A: In vitro Determination of the Allergenic Potential of Technologically Altered Hen's Egg. *J. Agric. Food Chem*. 2008. 56: 1727-1733.
75. Holden L, Faeste C, Egeas E: Quantitative Sandwich ELISA for the Determination of Lupine (*Lupinus spp.*) in Foods. *J. Agric Food Chem*. 2005. 53: 5866-5871.
76. Holden L, Sletten GBG, Lindvik H, Faeste CK, Dooper M: Characterization of IgE binding to lupin, peanut and almond with sera from lupin-allergic patients. *International Archives of Allergy and Immunology* 2008. 146(4): 267-276.

77. Hondelmann W: *Die Lupine, Geschichte und Evolution einer Kulturpflanze*, Braunschweig: Selbstverlag der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft. 1996.
78. Huynh NV: Deproteinization of bacterial genomic and plasmid DNAs by tannic acid. *Journal of Microbiological Methods* 2008. 75: 379–381
79. Ibanez Sandin D, Martinez San Ireneo M, Maranon Lizana F, Fernandez Caldas E, Alonso Lebrero E; Laso Borrego T: Specific IgE determinations to crude and boiled lentil (*Lens culinaris*) extracts in lentil-sensitive children and controls. *Allergy* 1999. 54: 1209-1214.
80. Jäger L, Wüthrich B, Bergmann R: *Nahrungsmittelallergien und -intoleranzen*. Immunologie, Diagnostik, Therapie, Prophylaxe /. 1. Aufl. Ulm: G. Fischer 1998.
81. Jäger L, Wüthrich B: *Nahrungsmittelallergien und –intoleranzen*, 2. überarbeitete Auflage 2002. Urban Fischer Verlag.
82. Jappe U, Vieths S: Lupine, a source of new as well as hidden food allergens; *Mol. Nutr. Food Res.* 2010. 54: 113-126.
83. Jeejeebhoy KN, Phillips MJ, Ho J, Bruce-Robertson A: Ultrastructural and functional studies of cultured adult rat hepatocytes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1980. 349: 18-27.
84. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, van Cauwenberge P, Williams HC: Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol* 2004. 113: 832-836.
85. Johnson SK, McQuillan PL, Sin JH, Ball MJ: Sensory acceptability of white bread with added Australian sweet lupin (*Lupinus angustifolius*) kernel fibre and its glycaemic and insulinaemic responses when eaten as a breakfast. *J Sci Food Agric* 2003. 83(13): 1366-1372.
86. Jong EC DE, Zijverden M Van, Spanhaak S, Koppelman SJ, Pellegrom H, PenninkS AH: Identification and partial characterization of multiple major allergens in peanut proteins. *Clin Exp Allergy* 1998. 28: 743-751.
87. Kay, AB: *Concepts of allergy and hypersensitivity*. Allergy and allergic disease. Blackwell Science, London 1997.
88. Keller, R: *Immunologie und Immunpathologie*. 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1987.
89. Kiosseoglou A, Doxastakis G, Alevisopoulos S: Physical characterization of thermally induced networks of lupin protein isolates prepared by isoelectric precipitation and dialysis. In: *International Journal of Food Science and Technology* 34 1999. Nr. 3: 253-263.
90. Klos P, Poreba E, Springer E, Lampart-Szczapa E, Gozdzicka Jozefiak A: Identification of a specific IgE-Binding protein from Narrow-Leafed lupin (*L. Angustifolius*) Seeds. *Journal of food science* 2010. 75: 39-42.
91. Koppelman SJ, Bruijnzeel-Koomen C A, Hessing M, de Jogh HH: Heat-induced conformational changes of Ara h 1, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties. *J. Biol. Chem.* 1999. 274: 4770-4777.

92. Kopper R, Kim A, Van Trang, Helm RM: Adsorption of Peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) Proteins by Activated Charcoal. J. of Agricultural and food Chemistry. 2008. 56: 10619-10624.
93. Korematsu S, Tanaka Y, Hosoi S, Koyanagi S, Yokota T, Mikami B, et al: C8/119S mutation of major mite allergen Derf-2 leads to degenerate secondary structure and molecular polymerization and induces potent and exclusive Th1 cell differentiation. J Immunol 2000. 165: 2895-2902.
94. Kreft D, Bauer R, Göhrlich R: Nahrungsmittelallergene – Charakteristika und Wirkungsweise 1995. Gruyter, Berlin/New York.
95. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4, Nature 1970. 227: 680-685.
96. Lanne B, Panfilov O: Protein staining influences the quality of mass spectra obtained by peptide mass fingerprinting after separation on 2-D gels. A comparison of staining with Coomassie Brilliant Blue and Sypro Ruby, Journal of Proteome Research 2004. 4: 175-179.
97. Lásztity R, Khalil MM, Haraszi R: Isolation, functional properties and potential use of protein preparations from lupin. In: *Nahrung/Food* 2001. 45, Nr.6: 396-398.
98. Lee YP, Mori TA, Puddey IB, Sipsas S, Ackland TR, Beilin LJ, Hodgson JM: Effects of lupin kernel flour-enriched bread on blood pressure: a controlled intervention study. American Journal of Clinical Nutrition 2009. 89(3): 766-772.
99. Lehrer SB, Horner WE, Reese G: Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. Crit Rev Food Sci Nutr 1996. 36(6): 553-564.
100. Leung D, Sampson H, Yunginger J, Wesley Burks A, Schneider L, Wortel C, Davis F, Hyun J, Shanahan WR: Effect of Anti -IgE Therapy in patients with peanut allergy. N England J Med 2003. 348: 986-993.
101. Lindvik, H, Holden L, Løvik M: Lupin sensitization and clinical allergy in food allergic children in Norway. In: *Acta Pædiatrica* 97. 2008. Nr. 1: 91-95.
102. Linhart B, Valenta R: Molecular design of allergy vaccines. Curr Opin Immunol. 2005. 17: 646-55.
103. Lqari H, Vioque J, Pedroche J, Millán F: *Lupinus angustifolius* protein isolates: chemical composition, functional properties and protein characterization. Food Chemistry 2002. 76: 349-356.
104. Luck G, Liao H, Murray N J, Grimmer HR, Warminski EE, Williamson MP: Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. Phytochemistry 1994. 37: 357–371.
105. Magni C, Ballabio C, Restani P, Sironi E, Scarafoni A, Poiesi C, Duranti M: Two-Dimensional Electrophoresis and Western-Blotting Analysis with anti Ara h3 Basic Subunit IgG Evidence the Cross-Reacting Polypeptides of *Arachis hypogaea*, *Glycine max* and *Lupinus albus* Seed Proteomes. J. Agric Food Chem. 2005. 53: 2275-2281.
106. Magni C, Herndl A, Sironi E, Scarafoni A, Ballabio C, Restani P, Bernardini R, Novembre E, Vierucci A, Duranti M: One- and Two-Dimensional electrophoretic identification of IgE-binding polypeptides of *Lupinus albus* and other legume seeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005. 53(11): 4567-4571.

107. Magni C, Scarafoni A, Herndl A, Sessa F, Prinsi B, Espen L, Duranti M: Combined 2D electrophoretic approaches for the study of white lupin mature seed storage proteome. *Phytochemistry* 2007. 68(7): 997-1007.
108. Magni C, Sessa F, Accardo E, Vanoni M, Morazzoni P, Scarafoni A, Duranti M: Conglutin gamma, a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2004. 15(11): 646-650.
109. Malanin K, Lundberg M, Johansson SGO: Anaphylactic reaction caused by neoallergens in heated pecan nut. *Allergy* 1995. 50: 988-991.
110. Maleki, S. J. Food processing: effects on allergenicity. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2004. 4: 241-245.
111. Malley A, Baecher L, Mackler B, Perlman F: The isolation of allergens from the green pea. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1975. 56: 282-290.
112. Malley A, Baecher L, Mackler B, Perlman F: The isolation of allergens from the green pea. *J Allergy Clin Immunol.* 1975. 56: 282-290.
113. Mekori YA: Introduction to allergic diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1996. 36: 1-18.
114. Melo TS, Ferreira RB, Teixeira AN: The seed storage proteins from *Lupinus albus*. *Phytochemistry* 1994 vol. 37: 3641-3648.
115. Metcalfe DD, Astwood JD, Townsend R, Sampson A, Taylor L, Fuchs RL: Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. In: *Critical reviews in food science and nutrition* 1996. Vol. 36: 165-86.
116. Mikkat S, Lorenz P, Scharf C, Yu X, Glocker MO, Ibrahim SM: MS characterization of qualitative protein polymorphisms in the spinal cords of inbred mouse strains. *Proteomics* 10, 2010. 1050–1062.
117. Mills EN, Sancho A, Rigby N, Jenkins J, Mackie A: Impact of food processing on the structural and allergenic properties of food allergens. *Mol. Food Nutr. Res Review.* 2009. 53: 963 – 969.
118. Mine Y, Zhang JW: Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins, *J Agric Food Chem.* 2002. 50: 2679-2683.
119. Mitaru BN, Reichert RD, Blair R: The binding of dietary protein by sorghum tannins in the digestive tracts of pigs. *Journal of Nutrition* 1984. 114: 1787–1796.
120. Moneret-Vautrin DA, Rance F, Kanny G, Olsewski A, Gueant J L, Dutau G, Guerin L: Food allergy to peanuts in France - evaluation of 142 observations. *Clin. Exp. Allergy* 1998. 28: 1113–1119.
121. Monsalve RI, Villalba M, Rico M, Shewry PR, Rodríguez R: The 2S albumin proteins. In E. N. Clare Mills, & P. R. Shewry (Eds.), *Plant food allergens* 2004: 42:56. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
122. Muel F, Carrouée B, & Grosjean F: Trypsin inhibitor activity of pea cultivars: new data and a proposal strategy for breeding programmes. In: *Proceedings of the 3rd European conference on grainlegumes* 1998. 164-165, 14-19 November 1998, Valladolid.
123. Müller U, Weber W, Hoffmann A, Franke S, Lange R, Vieths S: Commercial soybean lecithins: A source of hidden allergens? *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1998. 207: 341-351.

124. Natale M, Bisson C, Monti G, Peltran A, Garroffo LP, Valentini S, Fabris C, Bertino E, Coscia A, Conti A: Cow's milk allergens identification by two-dimensional immunoblotting and mass spectrometry, *Mol Nutr Food Res* 2004. 48: 363-369.
125. Naterman HL: Formalinized pollen protein precipitates with tannic acid or urea in desensitization treatment. *Journal of Allergy* 1965. 36(3): 226-233.
126. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., Ehrhardt, W.,. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9.1988. 255-262.
127. Niemeijer NR, de Monchy JGR, Meijer GH: Optimization, standardization and control of allergens. In: Wüthrich, B; Ortolani, C (eds): *Highlights in Food Allergy*. Karger, Basel, 1996. 50-56.
128. Official Journal of the European Union 23.12.2006: COMMISSION DIRECTIVE 2006/142/EC of 22 December 2006 amending Annex IIIa of Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council listing the ingredients which must under all circumstances appear on the labelling of foodstuffs.
129. Orlandi A, Grasso F, Corinti S, Marinaro M, Bonura A, Boirivant M, et al. The recombinant major allergen of *Parietaria judaica* and its hypoallergenic variant: *in vivo* evaluation in a murine model of allergic sensitization. *Clin Exp Allergy* 2004. 34: 470-477.
130. Ortolani C, Ispano M, Ansaloni R, Rotondo F, Incorvaia C, Pastorello EA: Diagnostic problems due to cross-reactions. *Allergy* 1998. 53:58-61.
131. Osterhoudt KC, Alpern ER, Durbin D, Nadel F, Henretig FM: Activated charcoal administration in a pediatric emergency department. *Pediatr. Emerg. Care* 2004. 20: 493-498.
132. Paschke A: Aspects of food processing and its effect on allergen structure. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009. 53: 959-962.
133. Pascual CY, Fernandez Crespo J, Sanchez Pastor S, Padial ma, Diaz Pena JM, Martin Munoz F, Martin Esteban M: Allergy to lentils in Mediterranean pediatric patients. *J Allergy Clin Immunol* 1999. 103: 154-158.
134. Pastorello EA, Robino AM: Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. *Mol Nutr Food Res* 2004. 48: 356-62.
135. Patra AK & Saxena J: Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food Agriculture* 2011. 91: 24-37.
136. Peeters K, Koppelman S, Penninks A, Lebens A, Bruijnzeel-Koolen C, Hefle S, Taylor S, van Hoffen E, Knulst A: Clinical relevance of sensitization to lupine in peanut-sensitized adults. *Journal compilation, Allergy* 2009. 64: 549-555.
137. Peeters K, Nordlee JA, Penninks AH, Chen L, Goodman RE: Lupine allergy: Not simply cross-reactivity with peanut or soy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2007. 120: 647-653.
138. Petterson DS, Colin W: *Lupin: Overview: Encyclopedia of Grain Science*, Oxford: Elsevier 2004. 166 – 174.

139. Petterson DS: The use of lupins in feeding systems - review. *Asian- Australian Journal of Animal Sciences*, 16, 2000. 6: 861-882.
140. Petterson DS: Composition and food uses of lupins, Gladstones, J. S., Atkins, C. und Hamblin, J.: *Lupins as crop Plant: Biology, Production and Utilization*: Wallingford: CAB International, 1998.
141. Pimentel D, Pimentel M: Sustainability of meat-based and plant-based diets and the environment. *American Journal of Clinical Nutrition* 78. 2003. 3: 660-663.
142. Prieto A, Razzak E, Lindo DP, Alvarez-Perea A, Rueda M, Baeza ML: Recurrent Anaphylaxis Due to Lupin Flour: Primary Sensitization Through Inhalation. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010; Vol 20(1): 76-79.
143. Prussin C, Metcalfe DD: IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *JACI* 2006. 117: 450-456
144. Randall A, Kopper, Arakim, Trang Van, Ricki M, Helm: Adsorption of Peanut (*Arachis hypogaea*, Leguminosae) Proteins by Activated Charcoal; *J. Agric. Food Chem.* 2008. 56: 10619–10624.
145. Reich S: Nahrungsmittelallergien – Allergien und pseudoallergische Reaktionen. *AID Verbraucherdienst* 1993. 38: 5-56.
146. Reinhard H, Rupp H, Sager F: Quinolizidine alkaloids and phomopsins in lupin seeds and lupin containing food. In: *Journal of Chromatography A*, 1112. 2006. 1-2: 353-360.
147. Restani P, Ballabio C, Corsini E, Fiocchi A, Isoardi P, Magni C, Poiesi C, Terracciano L, Duranti M: Identification of the basic subunit of Ara h 3 as the major allergen in a group of children allergic to peanuts. *Annals of Allergy Asthma & Immunology* 2005. 94(2): 262-266.
148. Ring J, Fuchs T, Schultze-Werninghaus G: *Weißbuch Allergie in Deutschland 2004* (2. aktualisierte Auflage), Urban & Vogel Medien und Medizin Verlagsgesellschaft mbH & Co KG München.
149. Ring J: Nahrungsmittelallergien und andere nahrungsbedingte Unverträglichkeitsreaktionen. *Akt Ernährung* 1989. 14: 49-56.
150. Röthlein B: Nachhaltige Nahrung, Gesundheit. http://www.fraunhofer.de/Images/weiter-vorn_4-10_54_tcm7-64485.pdf (03.02.2011).
151. Rouge P, Culerrier R, Sabatiera V, Granier C, Rance F, Barre A: Mapping and conformational analysis of IgE-binding epitopic regions on the molecular surface of the major Ara h 3 legumin allergen of peanut (*Arachis hypogaea*). *Molecular Immunology* 2009. 46(6): 1067-1075.
152. Sabine Gremmel: *In vitro* Untersuchungen des allergenen Potenzials von technologisch verändertem Hühnerei. Dissertation. Hamburg 2007.
153. Salcedo G, Sánchez-Monge R, Barber D, Díaz-Perales A: Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochim Biophys Acta* 2007. 1771: 781-791.
154. Sampson HA: Epidemiology of food allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 1996. 7(9): 42-50.
155. Sampson HA: Food allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1999. 103(5 Pt 1): 717-728. Review.
156. Sampson HA: Food Hypersensitivity: Manifestations, Diagnosis and Natural History. *Food Technol*, 1992. 46:141-144.

157. Sampson HA: Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol.*2004. 113(5): 805-819 Review.
158. Sanchez-Monge R, Pascual CY, Diaz-Perales A, Fernández- Crespo J, Salcedo, G: Isolation and characterization of relevant allergens from boiled lentils. *J. Allergy Clin. Immunol* 2000. 106: 955-961.
159. Sarikaya H, Tettenborn B: Akutes anticholinerges Syndrom auf Lupineningestion, *Akt Neurol* 2006. 33: 500-502.
160. Scheurer S, Sonnewald S: Genetic engineering of plant food with reduced allergenicity. *Frontiers in Bioscience* 2009. 14: 59-71.
161. Schmidt-Weber CB, Blaser K: Immunological mechanisms of specific allergen immunotherapy. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2006. 5(1): 15-21. Review.
162. Schmitt D, Nesbit J, Hurlburt B, Cheng H, Maleki S: Processing can Alter the Properties of Peanut Extract Preparations. *J. Agric. Food Chem.* 2010. 58: 1138-1143.
163. Scholl I, Untersmayr E, Bakos N, Roth-Walter F, Gleiss A, Boltz-Nitulescu G, Scheiner O, Jensen-Jarolim E: Antiulcer drugs promote oral sensitization and hypersensitivity to hazelnut allergens in BALB/c mice and humans. In: *The American journal of clinical nutrition*, 2005. Vol. 81(1): 154-160.
164. Schutt C, Broeker B: *Grundwissen Immunologie: Spektrum Akademischer Verlag* 2009.
165. Schweiggert U, Lanig K, Eisner P: Entwicklung ballaststoffangereicherter Backwaren mit Cholesterinsenken dem Potential, In: *Symposium of Functional Food*, Kiel: 2009.
166. Shaw J, Roberts G, Grimshaw K, White S, Hourihane J: Lupin allergy in peanut-allergic children and teenagers. *Journal compilation Allergy* 2008. 63: 370-373.
167. Shibasaki M, Suzuki S, Tajima S, Nemoto H, Kuruome T: Allergenicity of major component proteins of soybean. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1980. 61: 441-448.
168. Shridhar K, Sathe & Girdhari M Sharma: Effects of food processing on food allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 2009. 53: 970-978.
169. Sicherer SH, Sampson HA: Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 117(2 Suppl Mini Primer) 2006:470-475 Review.
170. Sipsas S: Lupin products - concepts and reality. In: "Lupins for health and wealth" 12th International lupin conference, Australia: 2008.
171. Sironi E, Seesa F, Duranit M: A simple procedure of lupin seed protein fractionation for selective food applications. In: *European Food Research and Technology*. 2005. 221: 145-150.
172. Sirtori E, Resta D, Brambilla F, Zacherl C, Arnoldi A: The effects of various processing conditions on a protein isolate from *Lupinus angustifolius*. *Food Chemistry* 2010. 120: 496-504.
173. Sormus de Castro Pinto S, Neves VA, Machado de Medeiros BM: Enzymatic Hydrolysis of Sweet Lupin, Chickpea and Lentil 11S Globulins Decreases their Antigenic Activity. *J. Agric. Food Chem.* 2009. 57: 1070-1075.
174. Staines N, Brostoff J, James K: *Immunologisches Grundwissen (3.Auflage)*, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 1999.
175. Sutton BJ, Gould HJ: The human IgE network. *Nature*. 1993. 366: 421-428.

176. Taylor SL, Lemanske RF, Bush RK, Busse WW: Food allergens: structure and immunologic properties. *Ann Allergy* 1997. 59: 93-99.
177. Toda M, Reese G, Gadermeier G, Schulten V, Lauer I, Egger M, Briza P, Randow S, Wolfheimer S, Kigongo V, San Miguel M, Fötisch K, Bohle B, Vieths S, Scheuer S: Protein unfolding strongly modulates the allergenicity and immunogenicity of Pru p3, the major peach allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2011. 128: 1022-1030.
178. Uhlemann L, Becker WM, Schlaak M: Nahrungsmittelallergie: Identifizierung und Charakterisierung von Erdnußallergenen mit Patientenseren und monoklonalen Antikörpern. *Z Ernährungswiss* 1993. 32: 139-151.
179. Vadas P, Perelman B: Activated charcoal forms non-IgE binding complexes with peanut proteins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003. 112: 175-179.
180. Valenta R, Ferreira F, Focke-Tejkl M, Linhart B, Niederberger V, Swoboda I, Vrtala S: From Allergen Genes to Allergy Vaccines Annual Review of Immunology 2009. 28: 211-241.
181. Venkatachalam M, Teuber SS, Roux KH, Sathe SK: Effects of roasting, blanching, autoclaving, and microwave heating on antigenicity of almond (*Prunus dulcis* L.) proteins. *J. Agric. Food Chem.* 2002. 50, 3544-3548.
182. Vieths S, Fischer K, Dehne LI, Bögl KW: Allergenes Potential von verarbeiteten Lebensmitteln. Teil 1: Beeinflussung durch lebensmitteltechnologische Verfahren und Zubereitungstechniken. *Ernährungs-Umschau*, 1994 b. 41: 140-143.
183. Vieths S, Scheurer S, Ballmer-Weber B: Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. *Ann N Y Acad Sci*, 2002. 964: 47-68 Review.
184. Vieths S, Schöning B, Baltes W: Allergy to fruits and vegetables in pollensensitive patients: Allergen characterisation by IgE immunoblotting and peroxidase staining, *Food Agr. Imm.* 1992a. 4: 181-197.
185. Vieths S; Aulepp H, Becker WM, Buschmann L: Characterization of labile and stable allergens in food of plant origin. In: Eisenbrand G, Aulepp H, Dayan AD, Elias PS, Grunow W, Ring J, Hlatzer J: Food allergies and intolerances. Verlag Chemie – Weinheim 1996. 130-148.
186. Viquez OM, Summer CG, Dodo HW: Isolation and molecular characterization of the first genomic clone of a major peanut allergen, Ara h 2. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2001, 107(4): 713-717.
187. von Pirquet, C: Allergie. *Münch med Wschr* 1906. 30: 1457.
188. von Sengbusch R: Süßlupinen und Öllupinen. Die Entstehungsgeschichte einiger neuer Kulturpflanzen 1942, Berlin, Verlag Paul Parey.
189. Vrtala S, Sperr WR, Reimitzer I: cDNA cloning of a major allergen from timothy grass (*Phleum pratense*) pollen; Characterization of the recombinant *Phl p V* allergen. *J. Immunol.* 1993. 151: 4773.
190. Vrtala S: From allergen genes to new forms of allergy diagnosis and treatment. *Allergy* 2008. 63: 299-309.

191. Wagner S, Radauer C, Bublin M, Hoffmann-Sommergruber K, Kopp T, Greisenegger EK: Naturally occurring hypoallergenic Bet v 1 isoforms fail to induce IgE responses in individuals with birch pollen allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2008. 121: 246-52.
192. Wait R, Gianazza E, Brambilla D, Eberini I, Morandi S, Arnoldi A, Sirtori C: Analysis of *Lupinus albus* Storage Proteins by two-Dimensional Electrophoresis and Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2005. 53: 4599-4606.
193. Weissmann E, Weissmann S: Allergenität von Lupinenprodukten, In: Wink, M: Lupinen 2001 Ergebnisse aus Forschung, Anbau und Verwertung, Dossenheim: Romneya-Verlag Dr. Coralie Wink, 2002.
194. Woodfolk JA, Hayden ML, Couture N, Platts-Mills TAE: Chemical treatment of carpets to reduce allergen: Comparison of the effects of tannic acid and other treatments on proteins derived from dust mites and cats. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1995. 96(3): 325–333.
195. Wüthrich B, Mittag B, Ballmer-Weber B: Die Pizza: eine Quelle von unerwarteten Allergenen – anaphylaktische Reaktion auf Lupinenmehl im Pizzateig und in einem Lebkuchen. In: *Allergologie* 2004. 27: 495-502.
196. Wüthrich B: Anaphylactic reaction to lupine flour because of a primary sensitization. In: *Allergy* 2008. 63: 476-477.
197. Wüthrich B: Zur Nahrungsmittelallergie: Begriffsbestimmungen, Diagnostik, Epidemiologie, Klink. *Schw med Wschr*, 1996. 126: 770-776.
198. Yasue M, Yokota T, Fukada M, Takai T, Suko M, Okudaira H, et al: Hyposensitization to allergic reaction in rDer f 2-sensitized mice by the intranasal administration of a mutant of rDer f 2, C8/119S. *Clin Exp Immunol* 1998. 113: 1-9.
199. Young E, Stoneham MD, Petrukevich A, Barton J, Bucks UK: A population study of food intolerance. *Lancet* 1994. 343: 1127-1130.
200. Zuidmeer L, van Ree R: Lipid transfer protein allergy: primary food allergy or pollen/ food syndrome in some cases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2007. 7: 269-73.
201. Zunker, K : Untersuchungen zur Allergenität der Mango und der Litchi. Dissertation Universität Hamburg, 2001.
202. <http://www.tri-vision.eu/downloads/antikoerper.jpg>
203. http://www.vegetarier-und-veganer.de/wp-content/uploads/2010/12/Blaue_Lupine.jpg
204. http://www.prolupin.de/tl_files/prolupin/images/rohstoff/Katrin_Petersen_mit_Lupinen-Samen.jpg
205. SDAP (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/index.html>; Stand 09/2013)
206. EVALLER™ <http://www.slv.se/en-gb/Group1/Food-Safety/e-Testing-of-protein-allergenicity/> ; Stand 09/2014; Martinez et al., 2007
207. Allermatch™ (<http://www.allermatch.org/>; Stand 09/2013; Fiers et al., 2004)
208. AllergenOnline ([http://www. Allergenonline.org/](http://www.Allergenonline.org/); Stand 12/2015)

209. P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk: Measurement of protein using bicinchoninic acid. In: Analytical biochemistry. Band 150, Nummer 1, Oktober 1985, S. 76–85, PMID 3843705. doi:10.1016/0003-2697(85)90442-7.
210. https://www.google.de/search?q=LDH+Test&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiD-6PNodDZAhXCzqQKHaudCY4Q_AUICygC&biw=1536&bih=731#imgsrc=iiv_OEaKeZpLAM:
211. <https://www.medicoconsult.de/Harnstoff/>
212. Standardarbeitsanweisung Abteilung für Labordiagnostik Klinikum Südstadt Rostock. Lothar Tomas: "Labor und Diagnose" 8. Auflage 2012.
213. Lipman, D.J.; Pearson, W.R.: Rapid and sensitive protein similarity searches. In: Science (New York, N.Y.) 1985. Vol. 227(4693): 1435_1441.
214. Steinmann, Alain. Dissertation: Etablierung eines Modellsystems zum Nachweis eines allergenen Potenzials in transgenen Pflanzen. 2011.
215. Sell, Marco. Dissertation: Studien zur Allergenität der heimischen Leguminose Gartenerbse (*Pisum sativum* L.) und Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris* L.). 2004.
216. Lorenz, Marion Yvonne. Dissertation: Charakterisierung ausgewählter Allergene aus Solanaceen und Untersuchungen zur Allergenität von Lebensmitteln nach Suppression der Allergene mittels "RNA Interferenz". 2007.
217. Sußmann, Daniela. Dissertation: Prozessoptimierung zur Isolierung von Proteinen aus *Lupinus angustifolius* L. cv. Vitabor und deren Potential als natürliches Fettsubstitut. 2011.
218. Schubert, Silke. Dissertation: Charakterisierung und Isolierung von Allergenen der Tomate (*Lycopersicon lycopersicum* (L.) Karst. ex Farw.).2003.
219. Ertl, Anna Katharina. Diplomarbeit: „Entwicklung und Validierung zweier kompetitiver ELISAs zur Detektion von potentiell allergener Lupine in Lebensmitteln“. 2011.
220. <http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/8/bc/vlu/faltung/stabilitaet.vlu/Page/vsc/de/ch/8/bc/faltung/denaturierung.vscml.html>
221. http://static.omegadiagnostics.com.s3.amazonaws.com/product-downloads/ifu/DI010106_D_IFU_Spez_IgE_Alpha5_german.pdf
222. <https://www.mein-allergie-portal.com/nahrungsmittelallergie-und-unvertraeglichkeiten/589-huelsenfruechte-sind-sie-nuetzlich-schaedlich-unvertraeglich-oder-allergen/seite-3.html>

8 Anhang

8.1 Proteinbestimmung

Tabelle 14: Proteinbestimmung der Lupinenfraktionen

Proteinfraktion	Proteingehalt 1 in [%]	Proteingehalt 2 in [%]	Proteingehalt 3 in [%]	Proteingehalt 4 in [%]	MW	Stabw
Lupinenmehlisolat	90,7	93,1	88,7	93,5	91,5	2,2
Lupindefasern	37,3	41,0	31,0	37,3	36,7	4,2
Lupinenflocken	19,0	23,0	25,0	22,7	22,4	2,5

Tabelle 215: Proteinbestimmung in % der Hitzebehandlung (Autoklav und Hitzebehandlung bei 100,150 und 200 °C).

	Proteingehalt t 1 in [%]	Proteingehalt t 2 in [%]	Proteingehalt t 3 in [%]	Proteingehalt t 4 in [%]	MW	Stabw
Lupinenmehlisolat	90,7	93,1	88,7	93,5	91,5	2,2
Autoklaviertes Mehl	75,0	79,0	74,0	73,0	75,3	2,6
Temp./Zeit	Proteingehalt t 1 in [%]	Proteingehalt t 2 in [%]	Proteingehalt t 3 in [%]	Proteingehalt t 4 in [%]	MW	Stabw
200 °C 5 min	80	86	72	85	80,8	6,4
200 °C 15 min	69	77	62	75	70,8	6,8
200 °C 30 min	54	65	49	69	59,3	9,3
150 °C 5 min	85	88	80	81	83,5	3,7
150 °C 15 min	81	82	69	73	74,7	6,3
150 °C 30 min	82	84	82	75	80,8	3,9
100 °C 5 min	87	92	91	85	88,8	3,3
100 °C 15 min	82	87	89	85	85,75	3,0
100 °C 30 min	85	80	85	84	83,5	2,4

Tabelle 3: Proteinbestimmung in [%] der Proteinmodifikationen Harnstoffbehandlung, Reduktion/Alkylierung.

Behandlung	Proteingehalt 1 in [%]	Proteingehalt 2 in [%]	Proteingehalt 3 in [%]	Proteingehalt 4 in [%]	MW	Stabw
Harnstoffbehandlung	89,98	88,01	90,03	90,69	89,6775	1,07
Reduktion/Alkylierung	97	96,99	95,89	96,98	96,715	0,55

Tabelle 4: Proteinbestimmung in [%] der Aktivkohlebehandlung

Behandlung	Proteingehal t	Proteingehal t	Proteingehal t	Proteingehal t	MW	Stabw
	1 in [%]	2 in [%]	3 in [%]	4 in [%]		
Aktivkohle Rohextrakt	67,1	68	66	69	67,5	1,28
Aktivkohle AC 5:1	60,8	64	61	62	61,9	1,47
Aktivkohle AC 10:1	53,2	55	54	50	53,0	2,16
Aktivkohle AC 20:1	31,2	32	33	29	31,3	1,70
Aktivkohle AC 30:1	23,2	26	28	27	26,1	2,05
Aktivkohle AC 40:1	25,6	26	27	24	25,7	1,25
Aktivkohle AC 50:1	15,1	14	11	16	14,0	2,18
Aktivkohle AC 60:1	4,1	5,2	3	4	4,1	0,90

Tabelle 5: Proteinbestimmung in [%] enzymatische Verdau mit Trypsin und Pepsin.

Behandlung	Proteingehal t	Proteingehal t	Proteingehal t	Proteingehal t	MW	Stabw
	1 in [%]	2 in [%]	3 in [%]	4 in [%]		
Trypsin Verdau						
nach 1 min	16,9	16,5	17,12	16	16,6	0,50
nach 5 min.	16,5	15,9	16,21	16,38	16,2	0,25
nach 15 min.	15,6	15,11	16,23	15,89	15,7	0,47
nach 30 min.	14,6	14,13	13,98	15,12	14,4	0,51
Pepsin Verdau						
nach 1 min	18,77	18,87	17,98	19,32	18,7	0,56
nach 5 min.	18,67	18,57	17,99	18,01	18,3	0,36
nach 15 min.	18,62	18,65	18,79	18,11	18,5	0,30
nach 30 min.	18,55	17,38	16,98	16,57	17,4	0,85

8.2 Enzymallergosorbent-Test (EAST) Durchführung

Chemikalien:

Aqua bidest

Verdünnungslösung zur Erstellung der Serum- und Allergenextraktverdünnung (NBS Puffer)

Testkit spez. IgE

Poolserum:

Poolserum herstellen und verdünnen mit NSB Puffer 1:2 (Omega Diagnostics, Reinbeck Deutschland). Die gemessene B0 Extinktion muss > 1,500 OD sein. B0: ungehemmte Serum (verdünntes Serumpool 1:2)

Testdurchführung:

1.Tag Herstellung der Verdünnungsreihe für die Referenz und die Probe(n):

11 Röhrchen:

1. 300µL Referenz/Probe

2.-11. 200 µl Verdünnungspuffer (NSB)

Aus dem 1. Röhrchen 100 µl in das 2. Röhrchen pipettieren und gut mischen.

Aus dem 2. Röhrchen 100 µl in das 3. Röhrchen pipettieren und gut mischen usw.

Die 100 µl aus dem 11 Röhrchen verwerfen.

Pipettierschema:

					Blank	B(0)	NSB	Std	Probe
Allergenträger					+	+	+	+	+
Verdünnungslösung [µl]:					-	50	100	-	-
STD bzw. Probe [µl]:					-	-	-	50	50
Poolserum [µl]:					-	50	-	50	50

Verdünnungslösung für NSB und B0 in Dreifachbestimmung pipettieren, Standard und Probe in Doppelbestimmung. In Kavität das verdünnte Poolserum pipettieren. MTP mit Deckel abdecken,

leicht mischen, und 15 min bei RT inkubieren. Allergenscheibe der zu untersuchende Leguminose in die MTP zugeben. Bei RT 18 - 22 h inkubieren.

2. Tag

MTP waschen (5 x)

50 µl Konjugat in jede Kavität pipettieren, außer Substratleerwert

MTP mit Deckel abdecken, leicht durchmischen. Inkubation bei RT ü.N. (18 - 22 h).

3. Tag

MTP waschen (5 x)

200 µl Substrat in jede Kavität inklusive Leerwert

MTP mit Deckel abdecken, leicht mischen

Inkubation bei RT 90 min (licht geschützt)

100 µl Stopplösung hinzugeben inklusive Substratleerwert

MTP im Photometer messen bei 405 nm

Auswertung

Nach der Formel:

$$[\%] \text{ Hemmung} = \frac{B(0) - B(x)}{B(0) - NSB} * 100$$

8.3 Enzymallergosorbent-Test (EAST)

Tabelle 6: EAST-Inhibition der verwendeten Lupinenfraktionen und Modifikationen: Homologes System

HOMOLOGES SYSTEM									
				Wert1	Wert2	Wert3	Mittelwert		
			NSB	0,369	0,377	0,385	0,377	100	
			B0	0,799	0,753	0,872	0,808		
Allergen-Scheibe:	Extrakt	Verdünnungen	Blank	0,22					
Lupine	Lupine	Konz. = 2,617 mg/mL	OD 1	% Inh. OD 1	OD 2	% Inh. OD 2	Stabw Inh. %	Konz. [µg/mL]	% Inhibition
		unverdünnt 2,617 mg/mL	0,479	76,3341067	0,438	85,8468677	6,72653783	0,0443	22,73000
		Verd. 1:3	0,437	86,0788863	0,491	73,549884	8,8593425	0,1329	39,21000
		Verd. 1:9	0,454	82,1345708	0,496	72,3897912	6,89059972	0,3988	43,15545
		Verd. 1:27	0,47	78,4222738	0,538	62,6450116	11,1562091	1,096	55,91647
		Verd. 1:81	0,505	70,3016241	0,507	69,837587	0,3281238	3,589	61,60093
		Verd. 1:243	0,504	70,5336427	0,515	67,9814385	1,80468088	10,76	69,25754
		Verd. 1:729	0,511	68,9095128	0,574	54,2923434	10,3358996	32,3	70,06961
		Verd. 1:2187	0,562	57,0765661	0,572	54,7563805	1,64061898	96,92	70,53364
		Verd. 1:6561	0,581	52,6682135	0,663	33,6426914	13,4530757	290,77	77,26218
		Verd. 1:19683	0,649	36,8909513	0,629	41,5313225	3,28123796	872,3	79,81439
		Verd. 1:59049	0,721	20,1856148	0,699	25,2900232	3,60936176	2617	81,09049
			NSB	0,451	0,449	0,452	0,45066667	100	
			B0	1,287	0,929	1,537	1,251		
Allergen-Scheibe:	Extrakt	Verdünnungen	Blank	0,296					
Lupine	Lupinen-Fasern	Konz. = 2,617 mg/mL	OD 1	Inhib OD1	OD 2	Inhib OD2	Stabw Inh. %	Konz. [µg/mL]	% Inhibition
		unverdünnt 2,617 mg/mL	0,54	88,8379842	0,491	94,9604332	4,32922519	0,0443	31,9866722
		Verd. 1:3	0,535	89,4627239	0,506	93,0862141	2,5621945	0,1329	52,2907122
		Verd. 1:9	0,607	80,4664723	0,513	92,2115785	8,30504424	0,3988	67,5343607
		Verd. 1:27	0,545	88,2132445	0,591	82,4656393	4,06417059	1,096	69,0962099
		Verd. 1:81	0,622	78,5922532	0,499	93,9608496	10,8672387	3,589	74,6563932
		Verd. 1:243	0,594	82,0907955	0,577	84,2149105	1,50197609	10,76	77,9675135
		Verd. 1:729	0,653	74,7188671	0,654	74,5939192	1,23692148	32,3	83,152853
		Verd. 1:2187	0,698	69,0962099	0,698	69,0962099	0,08835153	96,92	85,3394419
		Verd. 1:6561	0,704	68,3465223	0,717	66,7221991	0	290,77	86,3390254
		Verd. 1:19683	0,825	53,2278217	0,84	51,3536027	1,14856995	872,3	91,274469
		Verd. 1:59049	1	31,3619325	0,99	32,6114119	1,32527302	2617	91,8992087
			NSB	0,451	0,449	0,452	0,45066667	100	
			B0	1,287	0,929	1,537	1,251		
Allergen-Scheibe:	Extrakt	Verdünnungen	Blank	0,296					
Lupine	Lupinen-Flocken	Konz. = 2,617 mg/mL	OD 1	Inhib. OD1	OD 2	Inhib. OD2	Stabw Inh. %	Konz. [µg/mL]	% Inhibition
		unverdünnt 2,617 mg/mL	0,526	90,5872553	0,522	91,0870471	0,35340614	0,0443	14,6189088
		Verd. 1:3	0,562	86,0891295	0,484	95,8350687	6,89141969	0,1329	53,1653478
		Verd. 1:9	0,577	84,2149105	0,559	86,4639733	1,59032762	1,096	79,6543107
		Verd. 1:27	0,578	84,0899625	0,561	86,2140775	1,50197609	3,589	81,2161599
		Verd. 1:81	0,594	82,0907955	0,552	87,3386089	3,71076445	0,3988	78,2798834
		Verd. 1:243	0,587	82,9654311	0,574	84,5897543	1,14856995	32,3	84,7147022
		Verd. 1:729	0,627	77,9675135	0,575	84,4648063	4,59427979	10,76	83,7775927
		Verd. 1:2187	0,711	67,4718867	0,516	91,8367347	17,2285492	96,92	85,15202
		Verd. 1:6561	0,651	74,968763	0,598	81,5910037	4,68263133	290,77	85,3394419
		Verd. 1:19683	0,691	69,9708455	0,96	36,3598501	23,7665628	872,3	90,8371512
		Verd. 1:59049	1,031	27,4885464	1,237	1,74927114	18,2004161	2617	90,9620991
			NSB	0,479	0,441	0,483	0,46766667	100	
			B0	1,033	1,087	1,113	1,07766667		
Allergen-Scheibe:	Extrakt	Verdünnungen	Blank	0,317					
Lupine	Lupine	Konz. = 2,617 mg/mL	OD 1	Inhib. OD1	OD 2	Inhib. OD2	Stabw Inh. %	Konz. [µg/mL]	% Inhibition
		unverdünnt 2,617 mg/mL	0,9545	20,1912568	0,9795	16,0928962	2,89797861	0,0443	18,1420765
		Verd. 1:3	0,9035	28,5519126	0,9025	28,715847	0,11591914	0,1329	28,6338798
		Verd. 1:9	0,9	29,1256831	0,852	36,9945355	5,56411893	0,3988	33,0601093
		Verd. 1:27	0,865	34,863388	0,795	46,3387978	8,11434011	1,096	41,420765
		Verd. 1:81	0,811	43,715847	0,839	39,1256831	3,24573604	3,589	54,6174863
		Verd. 1:243	0,802	45,1912568	0,783	48,3060109	2,20246374	10,76	40,6010929
		Verd. 1:729	0,682	64,863388	0,807	44,3715847	14,4898931	32,3	46,7486339
		Verd. 1:2187	0,683	64,6994536	0,736	56,010929	6,14371466	96,92	60,3551913
		Verd. 1:6561	0,738	55,6830601	0,654	69,4535519	9,73720813	290,77	62,568306
		Verd. 1:19683	0,702	61,5846995	0,624	74,3715847	9,04169327	872,3	67,9781421
		Verd. 1:59049	0,673	66,3387978	0,609	76,8306011	7,41882525	2617	71,5846995

					Wert1	Wert2	Wert3	Mittelwert		
				NSB	0,479	0,441	0,483	0,46766667	100	
				B0	1,033	1,087	1,113	1,07766667		
				Blank	0,317					
Allergen-Scheibe:	Extrakt	Verdünnungen		OD 1	Inhib. OD1	OD 2	Inhib OD2	Stabw Inh.%	Konz. [µg/mL]	% Inhibition
Lupine	Lupine	Konz. = 2,617 mg/mL		0	0	0	0	0	0,0443	0
0,25 mg/mL	Tanninsäure	unverdünnt 2,617 mg/mL		0	0	0	0	0	0,0443	0
	Behandlung	Verd. 1:3		0,5885	80,1912568	0,5755	82,3224044	1,50694888	0,3988	43,8797814
		Verd. 1:9		0,6	78,3060109	0,6	78,3060109	0	1,096	59,1256831
		Verd. 1:27		0,61	76,6666667	0,594	79,2896175	1,85470631	96,92	71,5846995
		Verd. 1:81		0,6335	72,8142077	0,5775	81,9945355	6,49147209	3,589	73,8797814
		Verd. 1:243		0,6205	74,9453552	0,6085	76,9125683	1,39102973	32,3	75,4371585
		Verd. 1:729		0,602	77,9781421	0,633	72,8961749	3,59349348	10,76	75,9289617
		Verd. 1:2187		0,6685	67,0765027	0,5855	80,6830601	9,62128899	290,77	77,4043716
		Verd. 1:6561		0,641	71,5846995	0,641	71,5846995	0	0,1329	77,9781421
		Verd. 1:19683		0,6965	62,4863388	0,7375	55,7650273	4,75268492	872,3	78,3060109
		Verd. 1:59049		0,8	34,6174863	0,82	51,3387978	11,8237527	2617	81,2568306
					Wert1	Wert2	Wert3	Mittelwert		
				NSB	0,451	0,449	0,452	0,45066667	100	
				B0	1,287	0,929	1,537	1,251		
				Blank	0,296					
Allergen-Scheibe:	Extrakt	Verdünnungen		OD 1	Inhib. OD1	OD 2	Inhib. OD2	Stabw Inh.%	Konz. [µg/mL]	% Inhibition
Lupine	Lupine	Konz. = 2,617 mg/mL		0	0	0	0	0	0,0443	0
0,5 mg/mL	Tanninsäure	unverdünnt 2,617 mg/mL		0,5855	83,152853	0,5705	85,0270721	1,32527302	0,1329	72,2823823
	Behandlung	Verd. 1:3		0,569	85,214494	0,621	78,7172012	4,59427979	0,3988	73,8442316
		Verd. 1:9		0,5795	83,9025406	0,6165	79,2794669	3,26900678	1,096	75,6559767
		Verd. 1:27		0,593	82,2157434	0,615	79,4668888	1,94373376	3,589	77,9050396
		Verd. 1:81		0,5835	83,4027489	0,6475	75,4060808	5,65449821	10,76	78,1549354
		Verd. 1:243		0,5995	81,4035818	0,6515	74,906289	4,59427979	32,3	79,4044148
		Verd. 1:729		0,6275	77,9050396	0,6275	77,9050396	0	96,92	80,8413161
		Verd. 1:2187		0,658	74,0941274	0,633	77,2178259	2,20878836	290,77	81,5910037
		Verd. 1:6561		0,6595	73,9067055	0,6605	73,7817576	0,08835153	872,3	81,9658476
		Verd. 1:19683		0,6625	73,5318617	0,6825	71,032903	1,76703069	2617	84,0899625
		Verd. 1:59049								
					Wert1	Wert2	Wert3	Mittelwert		
				NSB	0,451	0,449	0,452	0,45066667	100	
				B0	1,287	0,929	1,537	1,251		
				Blank	0,296					
Allergen-Scheibe:	Extrakt	Verdünnungen		OD 1	Inhib. OD1	OD 2	Inhib. OD2	Stabw Inh.%	Konz. [µg/mL]	% Inhibition
Lupine	Lupine	Konz. = 2,617 mg/mL		0	0	0	0	0	0,0443	0
1,0 mg/mL	Tanninsäure	unverdünnt 2,617 mg/mL		0,5425	88,5256143	0,5625	86,0266556	1,76703069	0,1329	59,5376926
	Behandlung	Verd. 1:3		0,5645	85,7767597	0,6285	77,7800916	5,65449821	0,3988	69,9708455
		Verd. 1:9		0,626	78,0924615	0,594	82,0907955	2,8272491	1,096	70,970429
		Verd. 1:27		0,5725	84,7771762	0,6485	75,2811329	6,71471662	3,589	71,2827988
		Verd. 1:81		0,576	84,3398584	0,663	73,4693878	7,6865835	10,76	73,4693878
		Verd. 1:243		0,662	73,5943357	0,664	73,3444398	0,17670307	32,3	78,9046231
		Verd. 1:729		0,628	77,8425656	0,733	64,7230321	9,27691112	96,92	80,0291545
		Verd. 1:2187		0,664	73,3444398	0,702	68,5964182	3,35735831	290,77	80,0916285
		Verd. 1:6561		0,657	74,2190754	0,725	65,7226156	6,00790435	872,3	81,7784257
		Verd. 1:19683		0,7195	66,4098292	0,8295	52,665556	9,7186688	2617	87,2761349
		Verd. 1:59049								
					Wert1	Wert2	Wert3	Mittelwert		
				NSB	0,451	0,449	0,452	0,45066667	100	
				B0	1,287	0,929	1,537	1,251		
				Blank	0,296					
Allergen-Scheibe:	Extrakt	Verdünnungen		OD 1	Inhib. OD1	OD 2	Inhib. OD2	Stabw Inh.%	Konz. [µg/mL]	% Inhibition
Lupine	Lupine	Konz. = 2,617 mg/mL		0	0	0	0	0	0,0443	0
2,0 mg/mL	Tanninsäure	unverdünnt 2,617 mg/mL		0,6125	79,7792586	0,6375	76,6555602	2,20878836	0,1329	46,797235
	Behandlung	Verd. 1:3		0,6115	79,9042066	0,6565	74,2815494	3,97581905	0,3988	47,1198157
		Verd. 1:9		0,6145	79,5293628	0,6825	71,032903	6,00790435	1,096	60,2764977
		Verd. 1:27		0,652	74,8438151	0,684	70,845481	2,8272491	3,589	60,7373272
		Verd. 1:81		0,7315	64,910454	0,7905	57,5385256	5,21274054	10,76	71,3824885
		Verd. 1:243		0,772	59,8500625	0,753	62,2240733	1,67867916	32,3	71,5207373
		Verd. 1:729		0,883	45,9808413	0,873	47,2303207	0,88351535	96,92	80,0921659
		Verd. 1:2187		0,883	45,9808413	0,883	45,9808413	0	290,77	81,8894009
		Verd. 1:6561		1,018	29,1128696	1,032	27,3635985	1,23692148	872,3	83,2258065
		Verd. 1:19683		1,0265	28,0508122	1,0335	27,1761766	0,61846074	2617	84,0552995
		Verd. 1:59049								

					Wert1	Wert2	Wert3	Mittelwert		
				NSB	0,445	0,556	0,592	0,53766667		
				B0	0,828	0,808	0,817	0,81766667		
Allergen-	Extrakt	Verdünnungen		Blank	0,44					
Scheibe:	Trypsinolyse	Konz. = 2,617 mg/mL		OD 1	Inhib. % OD1	OD 2	Inhib. % OD2	Stabw. Inh. %	Konz. [µg/mL]	% Inhibition
Lupine		unverdünnt 2,617 mg/mL		0,56	53,8095238	0,555	58,8095238	3,53553391	0,0443	20,2380952
		Verd. 1:3		0,584	12,7380952	0,568	11,5238095	0,85862966	0,1329	33,8095238
		Verd. 1:9		0,623	8,45238095	0,567	8,27380952	0,12626907	0,3988	50,0595238
		Verd. 1:27		0,667	64,1666667	0,55	59,1666667	3,53553391	1,096	56,6666667
		Verd. 1:81		0,678	21,547619	0,601	14,8452381	4,73929902	10,76	57,0238095
		Verd. 1:243		0,682	92,0238095	0,602	87,3809524	3,28299577	3,589	62,7380952
		Verd. 1:729		0,638	1,30952381	0,678	1,53095238	0,15657364	32,3	63,6309524
		Verd. 1:2187		0,681	41,3095238	0,637	39,1666667	1,51522882	96,92	74,702381
		Verd. 1:6561		0,702	156,666667	0,653	157,02381	0,25253814	290,77	79,5238095
		Verd. 1:19683		0,794	49,8809524	0,652	48,7380952	0,80812204	872,3	86,3095238
		Verd. 1:59049		0,814	83,452381	0,708	64,5238095	13,3845212	2617	92,9166667
					Wert1	Wert2	Wert3	Mittelwert		
				NSB	0,445	0,576	0,592	0,53766667		
				B0	0,828	0,808	0,817	0,81766667		
	Extrakt	Verdünnungen		Blank	0,44					
	Pepsinolyse	Konz. = 2,617 mg/mL		OD 1	Inh. % OD1	OD 2	Inh. % OD2	Stabw in %	Konz. [µg/mL]	% Inhibition
		unverdünnt 2,617 mg/mL		0,543	98,0952381	0,55	95,5952381	3,56079	0,0443	20,2380952
		Verd. 1:3		0,537	100,238095	0,582	84,1666667	3,91434	0,1329	37,9166667
		Verd. 1:9		0,642	62,7380952	0,602	77,0238095	3,9	0,3988	52,5595238
		Verd. 1:27		0,572	87,7380952	0,677	50,2380952	5,34646	1,096	54,3452381
		Verd. 1:81		0,595	79,5238095	0,676	50,5952381	5,53059	3,589	54,702381
		Verd. 1:243		0,644	62,0238095	0,681	48,8095238	2,59099	10,76	55,4166667
		Verd. 1:729		0,676	50,5952381	0,653	58,8095238	4,6891	32,3	65,0595238
		Verd. 1:2187		0,678	49,8809524	0,653	58,8095238	2,54696	96,92	68,9880952
		Verd. 1:6561		0,662	55,5952381	0,679	53,8095238	4,92449	290,77	69,8809524
		Verd. 1:19683		0,76	20,5952381	0,663	55,2380952	2,44962	872,3	92,202381
		Verd. 1:59049		0,786	11,3095238	0,736	29,1666667	3,78807	2617	96,8452381

8.4 *in silico* Untersuchung Daten

<i>Lupinus angustifolius</i>		
Conglutin beta (7S seed storage globulin, vicilin)		
Alignment 1		
Sequence 1: Lup an 1		
Sequence 2: Allergen Lup an 1.0101, Sequence: ACB05815		
Sequence identity: 94.73 (611/645)		
Sequence 1	GIGBACBXCNGLTINBETALPINSANGSTIFLISMAKMRVRLPMLIILLG	
	-----MAKMRVRLPMLIILLG	
Sequence 2	-----MAKMRVRLPMLIILLG	
Sequence 1	VVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKEREHEPRQQPRPRQQEEQEREHR	
	VVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKEREHEPRQQPRPRQQEEQEREHR	
Sequence 2	VVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKEREHEPRQQPRPRQQEEQEREHR	
Sequence 1	REEKHDGEPGRSRQSEESQEEHERRREHRREREQQPRPQRRQEEEE	
	REEKHDGEPGRSRQSEESQEEHERRREHRREREQQPRPQRRQEEEE	
Sequence 2	REEKHDGEPGRSRQSEESQEEHERRREHRREREQQPRPQRRQEEEE	
Sequence 1	EEEEWQPRRQRPQSRREEREEREQQGSSSGSQRGGGDERRQHRERRVHR	
	EEEEWQPRRQRPQSRREEREEREQQGSSSGSQRGGGDERRQHRERRVHR	
Sequence 2	EEEEWQPRRQRPQSRREEREEREQQGSSSGSQRGGGDERRQHRERRVHR	
Sequence 1	EEREQQDSRSDSRQRNPYHFSSNRFQTYRNRNGQIRVLERFNQRTNR	
	EEREQQDSRSDSRQRNPYHFSSNRFQTYRNRNGQIRVLERFNQRTNR	
Sequence 2	EEREQQDSRSDSRQRNPYHFSSNRFQTYRNRNGQIRVLERFNQRTNR	
Sequence 1	LENLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFILVVLNGRATITIVNPKRQV	
	LENLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFILVVLNGRATITIVNPKRQV	
Sequence 2	LENLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFILVVLNGRATITIVNPKRQV	
Sequence 1	YNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVAKLAIPINNPGKLYDFYPST	
	YNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVAKLAIPINNPGKLYDFYPST	
Sequence 2	YNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVAKLAIPINNPGKLYDFYPST	
Sequence 1	TKDQQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIERVLLGDELQENKQRRGQEQS	
	TKDQQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIERVLLGDELQENKQRRGQEQS	
Sequence 2	TKDQQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIERVLLGDELQENKQRRGQEQS	
Sequence 1	HQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSGEGKPSESGPFNLRSNKP IYSNKF	
	HQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSGEGKPSESGPFNLRSNKP IYSNKF	
Sequence 2	HQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSGEGKPSESGPFNLRSNKP IYSNKF	
Sequence 1	GNFYEITPDINPQFQDLNISLTFTEINEGALLPHYNSKAI FIVVDEGE	
	GNFYEITPDINPQFQDLNISLTFTEINEGALLPHYNSKAI FIVVDEGE	
Sequence 2	GNFYEITPDINPQFQDLNISLTFTEINEGALLPHYNSKAI FIVVDEGE	
Sequence 1	GNYELVGIRDQQRQQDEQEEYEQGEDEVRRYSKLSKGDVFI I PAGHPL	
	GNYELVGIRDQQRQQDEQEEYEQGEDEVRRYSKLSKGDVFI I PAGHPL	
Sequence 2	GNYELVGIRDQQRQQDEQEEYEQGEDEVRRYSKLSKGDVFI I PAGHPL	
Sequence 1	SINASSNLRLLGFGINANENQRNFLAGSEDNVIKQLDREVKELTFPGSIE	
	SINASSNLRLLGFGINANENQRNFLAGSEDNVIKQLDREVKELTFPGSIE	
Sequence 2	SINASSNLRLLGFGINANENQRNFLAGSEDNVIKQLDREVKELTFPGSIE	
Sequence 1	DVERLIKNNQQSYFANAQPPQQQQREKEGRRGRRGP ISSILNALY	
	DVERLIKNNQQSYFANAQPPQQQQREKEGRRGRRGP ISSILNALY	
Sequence 2	DVERLIKNNQQSYFANAQPPQQQQREKEGRRGRRGP ISSILNALY	

<i>Lens culinaris</i>	
Linse	

Sequence 1: Lup an 1	
Sequence 2: Allergen Len c 1.0102, Sequence: CAD87731	
Sequence identity: 38.29 (247/645)	
Sequence 1	GIGBACBXCNGLTINBETALPINSANGSTIFLISMAKMRVRLPMLILLG
Sequence 2	-----
Sequence 1	VVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKEREHEPRQQPRPRQQEEQEREHR
Sequence 2	-----
Sequence 1	REEKHDGEPsRGRSQSEESQEEHEHRRERHRREREQQPRPQRREEEE
Sequence 2	-----
Sequence 1	EEEEWQPRRQRPQSRREEREEREQEQSSSGSQRGGGDERRQHRERRVHR
Sequence 2	-----
Sequence 1	EEREQEQDSRSDSRQRNPYHFSSNRQTYRNRNGQIRVLERFNQRTNR
Sequence 2	-----SRSD---Q-NP--F-SNRQ-T-Y-N-NG-IR-L--F--R---
Sequence 1	LENLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFILVVLNGRATITIVNPKRQV
Sequence 2	-----SRSD---QENPFIFKSNRFQTIYENENGHIRLLQKFDKRSKI
Sequence 1	LENLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFILVVLNGRATITIVNPKRQV
Sequence 2	-----SRSD---QENPFIFKSNRFQTIYENENGHIRLLQKFDKRSKI
Sequence 1	LENLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFILVVLNGRATITIVNPKRQV
Sequence 2	-----SRSD---QENPFIFKSNRFQTIYENENGHIRLLQKFDKRSKI
Sequence 1	YNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVAKLAIPINNPGKLYDFYPST
Sequence 2	-----SRSD---QENPFIFKSNRFQTIYENENGHIRLLQKFDKRSKI
Sequence 1	TKDQQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIERVLLGDDELQENEKQR--RGQE
Sequence 2	-----SRSD---QENPFIFKSNRFQTIYENENGHIRLLQKFDKRSKI
Sequence 1	QSHQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSGEGKPSSESGPFNLRSNKPIYSN
Sequence 2	-----SRSD---QENPFIFKSNRFQTIYENENGHIRLLQKFDKRSKI
Sequence 1	KFGNFYEITPDINPQFQDLNISLTFTTEINEGALLPHYNSKAI FIVVVDE
Sequence 2	-----SRSD---QENPFIFKSNRFQTIYENENGHIRLLQKFDKRSKI
Sequence 1	GEGNYELVGIRD--QQRQQDEQEEYEQGEEEVRRYSKLSKGDVFIIPA
Sequence 2	-----SRSD---QENPFIFKSNRFQTIYENENGHIRLLQKFDKRSKI
Sequence 1	GHPLSINASSNLRLLGFGINANENQRNFLAGSEDNVIKQLDREVKELTFP
Sequence 2	-----SRSD---QENPFIFKSNRFQTIYENENGHIRLLQKFDKRSKI
Sequence 1	GSIEDVERLIKNQQQSYFANAQPOQQQQREKEGRRGRGPISSILNALY
Sequence 2	-----SRSD---QENPFIFKSNRFQTIYENENGHIRLLQKFDKRSKI

Arachis hypogaea	
Erdnuss	
Vicilin; Clone P17	

Sequence 1: Lup an 1	
Sequence 2: Allergen Ara h 1, Sequence: P43237	
Sequence identity: 44.96 (290/645)	
Sequence 1	GIGBACBXCNGLTINBETALPINSANGSTIFLISMAKMRVRLPMLLILLG
	-----MR-R---L-ILLG
Sequence 2	-----MRGRVSPMLMLLLG
Sequence 1	VVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKER--EEEEHEP---RQQPRPRQQEEQ
	---L---S---A-----T-NP---R-----EP---Q-----
Sequence 2	ILVLASVSATQAKSPYRK TENPCAQRCLQSCQQEPDDLKQKACESRCTKL
Sequence 1	EREHR-----REEKHD-GEPSRGRSQSEESQEEEHERRREHRREREQE
	E---R-----H-GE--RGR-----RR-E-R---E
Sequence 2	EYDPRCVYDTGATNQ RHPPGERTRGRQPGDYDDRRQPRREGGRWGPAE
Sequence 1	QQPRPQRRQEE-EEEEEWQ-PRRQRPSRREEREEREQE QGSSSGSQRG
	--PR---R-E-----E-W--P-Q-P---R-E-E-EQE-G-----
Sequence 2	--PREREREEDWRQPREDWRRPSHQQPRKIRPEGREGEQE WGT P-----
Sequence 1	GGDERRQHRERRVHREEREQE QDSRSDSRRQRNPYHFSSNRFQTYRNRN
	-G-E-R-----E--SR-----NP--F-S-RF-T-Y-N-N
Sequence 2	-GSEVR-----EETSRN-----NPFYFPSRRFSTRYGNQN
Sequence 1	GQIRVLERNQRTNRLNLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFILVVLN
	G-IRVL-RF-QR-----NLQN-RI-----PNTL-LPKH-DAD-ILV---
Sequence 2	GRIRVLQRFQDQSKQFQNLQNHRIVQIEARPNTLVLPKHADADNILVIQQ
Sequence 1	GRATITIVNPKRQVYNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVAKLAI
	G-AT-T--N---R---NL--G-ALR-P-G--SYILN--DNQNLRVAK---
Sequence 2	GQATVTVANGNNRKSFNLDGHALRIPSGFISYILNRHDNQNLRVAKISM
Sequence 1	PINNPGLYDFYPSTTKDQQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIERVLLGDD
	P-N-PG---DF-P----DQ-SY--GFS-NTLEA-FN----EI-RVLL---
Sequence 2	PVNTPGQFEDFFPASSRDQSSYLQGF SRNTLEAAFAEFNEIRRVLLEEN
Sequence 1	E--LQENEQRRGQEQSHQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSGEGKPSE
	----QE---QRR----S---EGVIV-VSK---QEL-KHA-S-S--G---E
Sequence 2	AGGEQEERGQRRRSTRSSDNEGVIKVSKEHVQELTKHAKSVSKKGSEEE
Sequence 1	--SGPFNLSNPKPIYSNKFNFYEITPDI-NPQFQDLNISLTFTTEINEGA
	----P-NLR---P--SN-FG---E--PD--NPQ-QDL---LT--EI-EGA
Sequence 2	DITNPINLRDGE PDL SNNFGRLEFVKPKKPNQLQDLDMMLTCVEIKEGA
Sequence 1	LLLPHYNSKAIFIVVVDEGEGNYELVGIRDQQRQDQDEQEEYEQGE---
	L-LPH-NSKA--IVVV--G-GN-ELV--R--Q-Q----E-E-E--EE---
Sequence 2	LMLPHFNSKAMVIVVVNKG TGNLELVAVRKEQQQRGRREQE WEEEEDEE
Sequence 1	-----EVRRYSKLSKGDVFIIPAGHPLSINASSNLRLLGFGINANENQ
	-----EVRRY---L--GDVFI-PA-HP--INASS-L-LLGFGINA--N-
Sequence 2	EEGSNREVRRYTARLKEGDVFI MPAAHPVAINASSELHLLGFGINAENNH
Sequence 1	RNFLAGSEDNVIKQLDREVKELTFPGSIEDVERLIKNQQQSYFANAQPQQ
	R-FLAG--DNVI-Q-----K-L-FPGS-E-VE-LIKNQ--S-F--A-PQ-
Sequence 2	RIFLAGDKDNVIDQIEKQAKDLAFPGSGEQVEKLIKQRESHFVSAR PQS
Sequence 1	Q-----QQREKEGRRRRGPISSILNALY
	Q-----E---G--GP--SIL-A--
Sequence 2	QSPSSPEKEDQEENQGGKGPLL SILKAFN

Glycine max			
Sojabohne			
Beta-conglycinin (vicilin, 7S globulin); Alpha subunit			

Sequence 1: Lup an 1	
Sequence 2: Allergen Gly m 5.0201, Sequence: Q9FZP9	
Sequence identity: 44.81 (289/645)	
Sequence 1	GIGBACBXCNGLTINBETALPINSANGSTIFLI SMAKMRVRLPMLILLLG
Sequence 2	-----
Sequence 1	VVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKEREEEEHEPRQQPRPR-QQEEQERE-
Sequence 2	-----EEEE-E-Q-PRPR-Q--E-ER--
Sequence 1	HRREEKHGDEPSRGR---SQSEESQEEHEHRRERHREEREQQPRPQRR
Sequence 2	H---E--GE--R-----QEEHE--EH--R-E-----
Sequence 1	HGEKEEDEGEQPRPFPRPRQPHQEEHEQKEHEWHRKEEKHG--GKG
Sequence 2	-----VEEEEC EEGQIPRPRQHPERERQQ
Sequence 1	QEEEEEEEWQPRRQRPQSRREEREEREQEGSSSGSQRGGGDERROHRE
Sequence 2	---EE--E-E--PR--P---EE--E---Q---G-----E--Q---
Sequence 1	RRVHREEREQE-QDSRSDSRRQR--NPYHFSNRFTYYRNRNGQIRVLE
Sequence 2	-----E-E-E--S---RR---NP-HF-S-RFQT---N--G--RVL-
Sequence 1	RFNQR TNRLNLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFLVVLNGRATITI
Sequence 2	RFN-R---L-ML--YRI-EF-SKPNTL-LP-H-DAD---V-LNG-A--T-
Sequence 1	VNPKRQVYNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDDNQLRVAKLAIPINNP GK
Sequence 2	VN-D-R--YNL--GDALR-PAGTT-Y--NPD---NLR---LAIP-N-PG-
Sequence 1	LYDFYPSTTKDQQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIERVLLGDDELQEN EK
Sequence 2	---F--S-T--QQSY--GFSKN-LEA---T--EEI--VL-G--E-----
Sequence 1	QRRGEQSHQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSGEGKPSGPFNLRSN
Sequence 2	Q--G-E----E-VIV--SKKQI-EL-KHA-SSS----SE--PFNLRS-
Sequence 1	KPIYSNKFGNFYEITPDINPQFDLNLISLTFTEIN EGALLLPHYNSKAI F
Sequence 2	-PIYSNK-G---EITP--NPQ--DL---L-----NEGAL-LPH-NSKAI-
Sequence 1	IVVDEGEGNYELVGIRDQQRQQDEQEEFYEQGEFVRRYSKLSKGDVF
Sequence 2	--V--EGE-N-ELVGI--QQ--Q---E---E-----VR-Y---LS--D-F
Sequence 1	IIPAGHPLSINASSNLRLLGFGINANENQRNFLAGSEDNVIKQLDREVKE
Sequence 2	-IPAG-P---NA-S-L----FGINA--NQRNFLAGSDNVI-Q---V-E
Sequence 1	LTFPGSIEDVERLIKNOQQSYFANAQPOQQQREKEGRRGRRGPISILN
Sequence 2	L-FPGS--D-E-LIK-Q--SYF--AQPOQ-----EG--GR-GP-SSIL-
Sequence 1	ALY
Sequence 2	AFY

<i>Vigna radiata</i>	
Mungobohne	
8S Globulin (Vicilin)	

Sequence 1: Lup an 1	
Sequence 2: Allergen Vigna r 2.0201, Sequence: B1NPN8	
Sequence identity: 37.83 (244/645)	
Sequence 1	GIGBACBXCNGLTINBETALPINSANGSTIFLISMAKMRVRLPMLILLG
Sequence 2	-----
Sequence 1	VVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKEREHEPRQQPRPRQQEEQEREHR
Sequence 2	-----
Sequence 1	REEKHGEPSPGRSQSEESQEEHEHRRREHRREREQQPRPQRRQEEEE
Sequence 2	-----
Sequence 1	EEEEWQPRRQRPOSRREREEREQEQGSSSGSQRGGDERRQHRERRVHR
Sequence 2	-----MVRARIPLLLLLGILFLASLSVSFQIVHR
Sequence 1	EEREQEQDSRSDSRQRNPYHFSSNR-FQTYRNRNGQIRVLERFNQRTN
Sequence 2	ENIDGAEVSVS--RGKNPFYFNSDRWFHTLFRNQFGHLRLVLRQFDQRSK
Sequence 1	RLENLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFILVVLNGRATITIVNPKRQ
Sequence 2	QMQNLENYRVVELMSKPNTLLLPHHADADFLVVLNGRAVLTLVNPQGRD
Sequence 1	VYNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVAKLAIPINNPGLYDFYPS
Sequence 2	SNILEQGHAKIPAGTTFFLVNPDNENLRIKLAVPVNPNHRFQDFFLS
Sequence 1	TTKDQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIERVLLGDDELQENKQRRGQEQ
Sequence 2	STEAQQSYLQGFKNILEASFDSDIKEISRVLFGE---EGQQQQQGES
Sequence 1	SHQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSGEGKPSESGPFNLRNPKPIYSNK
Sequence 2	QEGVIVELKREIRELTKHAKSSSKSLSEDDQPFNLRNPKPIYSNK
Sequence 1	FGNFYEITPDINPQFQDLNISLTFTEINEGALLPHYNSKAI FIVVDEG
Sequence 2	LGRWFEITPEKNPQLRDLDMFIRSVDMEKESLLLPHYNSKAI VILVINEG
Sequence 1	EGNYELVGIRDQQRQQDEQEEYEQGEVEVRRYSKLSKGDVFIIPAGHP
Sequence 2	KANIELVGQREQQKQEEQEESEWE----VQRYRAELSEDDVFIIPATYP
Sequence 1	LSINASSNLRLLGFGINANENQRNFLAGSEDNVIKQLDREVKELTFPGSI
Sequence 2	VAINATSNLNFFAFGINAENQRNFLAGKDNVISEIPTVLDVTFPASG
Sequence 1	EDVERLIKNOQSYFANAQPPQQQQREKEGRRGRRGPISILNALY
Sequence 2	EKVKKLIKQSESQFVDAQPEQQE-RE-EARKGGKGPVY-----

<i>Juglans regia</i>	
Walnuss	
vicilin	

Sequence 1: Lup an 1	
Sequence 2: Allergen Jug r 2, Sequence: AAF18269	
Sequence identity: 34.42 (222/645)	
Sequence 1	GIGBACBXCNGLTINBETALPINSANGSTIFLISMAKMRVRLPMLILLG
Sequence 2	-----RGRDDDEENPRDPREQYRQCQEYCRRQGQGQ
Sequence 1	VVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKEREHEPRQQPR-PRQQEEQEREH
Sequence 2	-----E-D-----ER-----Q-PR-P-Q-EQ----
Sequence 1	RREEKHDGEPSSRGRSQSEES-QEEHEHRRREHHREREQEQQPRPQRRQEE
Sequence 2	-----E---R---E---Q-EE-ER-R---R---Q-Q---R-QRR---
Sequence 1	CERQRRGQEQTLCTRRRCERQRRQEEERERQRGRDRQDPQQQYHRCQRRQCI
Sequence 2	-----P-RQR---R-ER---EQ-----G--RG---E---RE-R-
Sequence 1	EEEEEEWQPRRQRPSRREEREEREQEGSSSGSQRGGDERRQHRRERV
Sequence 2	QE-----SPERQRCQRCERQYKEQ-----GRERG--PEASPRRESR-
Sequence 1	HREEREQEQDSRSDSRQRNPYHFSNRFTYYRNRNGQIRVLERFNRQT
Sequence 2	-----REE--Q-----NPY-F-S-----G----LERF--RT
Sequence 1	NRLENLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFILVVLNGRATITIVNPKDR
Sequence 2	-----L----NYR-----PNT--LP-H-DA----VV--GRAT-T-V----R
Sequence 1	ELLRGIENYRVVILDANPNTSMLPHHKDAESVAVVTRGRATLTLVSQETR
Sequence 2	-----QVYNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDNDQNLRVAKLAI PINNPGKLYDFYP
Sequence 1	---NLE-GD--R-PAG-T-Y--N-D-N--L---KL--P-NNPG-----Y-
Sequence 2	ESFNLECGDVIRVPAGATVYVINQDSNERLEMVKLLQPVNNPGQFREYYA
Sequence 1	STTKD-QQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIERVLLGDDELQENKQRRGQ
Sequence 2	---K---QSY---FS---L-A--NT-----ER-----
Sequence 1	EQSHQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSGE--GKPSESGPFNLRSNKPI
Sequence 2	-Q-Q-EGVI-R-S-----L--HA-S-----G-S-GP-L-S--P-
Sequence 1	DQQEQREGVIRASQEKLRALSQHAMSAGQRPWGRRSSGGPISLKSESPS
Sequence 2	YSNKFNGFYEITPDINPQFQDLNISLTFTEINEGALLLPHYNSKAI FIVV
Sequence 1	YSN-FG-F-E--P---Q-Q-----EI--GA---PHYNSKA---V-
Sequence 2	YSNQFGQFFEACPEEHRQLQEMDVLVNYAEIKRGAMMVPHYNSKATVVVY
Sequence 1	VDEGEGNYELV--GIRDQQRQ-QDEQEEYEQGEEEVRRYSKLSKGDVF
Sequence 2	V-EG-G-YE-----Q---Q---E-E-E-----L--GD-F
Sequence 1	VVEGTGRYEMACPHVSSQSYEGQGRREQEEESTGRFQKV TARLARGDIF
Sequence 2	IIPAGHPLSINASS--NLRLLGFGINANENQRNFLAGSEDNVIKQLDREV
Sequence 1	-IPAGHP--I-AS---NLRLLGF-IN---NQR-FLAG---N-I-QL-RE-
Sequence 2	VIPAGHPAIATASQENENLRLLGFDINGENNQRDFLAG-QNNI INQLEREA
Sequence 1	KELTFPGSIEDVERLIKNNQQSYFANAQPQQQQREKEGRRGRRGPISSI
Sequence 2	KEL-F----E--E-----Q--SYF---P---Q-R---GR-----P--SI
Sequence 1	KELSFNMPREEIEEIFESQMESYFV---PTERQSRRGQGRDH---PLASI
Sequence 2	LNALY-
Sequence 1	L-----
Sequence 2	LDFAFF

Sesamum indicum	
Sesam	
7S vicilin-like globulin	

Sequence 1: Lup an 1

Sequence 2: Allergen Ses i 3, Sequence: AAK15089

Sequence identity: 32.40 (209/645)

Sequence 1 GIGBACBXCNGLTINBETALPINSANGSTIFLISMAKMRVRLPMLILLLG
-----L---

Sequence 2 -----MSCGGRLLCL

Sequence 1 VVF-LLAASIGIAYGEKDFTKNPPKEREEEEHEPRQQPRPRQQE---EQE
V-F-LL-AS---A---KD---P-----QQ---Q-E-----

Sequence 2 VLFALLLASAVVASESKD----PELKQCKHQCKAQQQISKEQKEACIQAC

Sequence 1 REHRREEKHDGEPSSGRSQSEESQEEHEHRRREHHREREQ---EQQPRP
-E-R-KH-GE-RG---E-EE-R---R-RE---EQQ---

Sequence 2 KEYIRQ-KHQGEHGRGGDILE--EEVWNRKSPIERLRECSRGEQQHGE

Sequence 1 QRRQEEEEEEFWQPRRQRPQSRREEREEREQEQGSSSGSQRG-GGDERR
QR-----EE-Q---R-----E---Q-----G-GG---R

Sequence 2 QREECLRRQCEYQREKGRQDDDNPTDPEKQYQQCRLQCRRQEGGGGFSR

Sequence 1 QHRERRVHREEREQEQDSRSDSR-----RQRNPYHFSS
-H-ERR--REE--EQ-R---R-----R-R-PY-F--

Sequence 2 EHCERR--REEKYREQQGREGGRGEMYEGREREEREQEEQGRGRIPIYVFED

Sequence 1 NRFQTYRNRNGQIRVLERFNQRTNRLENLQNYRIIEFQSKPNTLILPKH
--F-T-R---G-RVL--F--R---L---NYR-----P-T-I-P-H

Sequence 2 QHFITGFRTQHGRMRVLQKFTDRSELLRGIENYRVAILEAEPQTFIVPNH

Sequence 1 SDAFIFLVVLNGRATITIVNPDKRQVYNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDD
-DA-----V--GR-TI--V--D-R---N--QGD-L--AGTT-Y--N-D-

Sequence 2 WDAESVVFVAKGRGTISLVRQDRRESLNIKQGDILKINAGTTAYLINRDN

Sequence 1 NQNLRVAKLAIPINNPGKLYDFYPSTTKDQQSYFSGFSKNTLEATFNTRY
N--L--AKL--P---PG---F-----S-F--FS---LEA-FNTR-

Sequence 2 NERLVLAKLLQPVSTPGEFELFFGAGGENPESFFKSFDEILEAAFNTRR

Sequence 1 EEIERVLLGDDELQENKQRRGQEQSHQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQS
---R-----GQ---Q-GVIV--S-Q-----H---

Sequence 2 DRLQRIF-----GQ---QRQGVIVKASEEQVRAMSRHEEG

Sequence 1 S----SGEGKPSESGPFNLRSNKPIYSNKFGNFYEITPDINPQFQDLNIS
-----GE-K---G--N-----P--SN--G---E-----Q--DL---

Sequence 2 GIWPFGGESK---GTINIYQQRPTHSNQYQQLHEVDASQYRQLRDLDLT

Sequence 1 LTFTEINEGALLPHYNSKAIFIVVVDEGEGNYELVGIRODQQRQDEQEE
-----I--GA---PHYNSKA--I--V--GEG--E-----Q-E

Sequence 2 VSLANITQGAMTAPHYNSKATKIALVVDGEGYFEMACPHMSRSRGSYQGE

Sequence 1 EYEQGEFVRRYSKLSKGDVFIIPAGHPLSINASS--NLRLLGFGINAN
----G-----R----L--G-V-IIPAGHP---ASS--NL--L-F--NAN

Sequence 2 T--RGRPSYQRVASRLTRGTVVIIIPAGHPFVAVASSNQNLQVLCFEVNAV

Sequence 1 ENQRNFLAGSEDNVIKQLDREVKELTFPGSIEDVERLIKNNQQQSYFANAQ
-N---LAG---NV--QL-RE-KEL-F-----VE-----QQ---F----

Sequence 2 NNEKFPLAGRR--NVMNQLEREAKELAFGMPAREVEEVSRSQEEFFFKGP

Sequence 1 PQQQQQREKEGRRGRRGPISILNALY
-QQQQ-R-----

Sequence 2 RQQQQGRADA-----

<i>Corylus avellana</i>		
Haselnuss		
7S vicilin-like protein; 48-kDa Glycoprotein		

Sequence 1: Lup an 1		
Sequence 2: Allergen Cor a 11, Sequence: AAL86739		
Sequence identity: 25.43 (164/645)		
Sequence 1	GIGBACBXCNGLTINBETALPINSANGSTIFLI	SMAKMRVRLPMLILLG
Sequence 2	-----	-----
Sequence 1	VVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKERE	EEEEHEPRQQPRPRQEEQEREHR
Sequence 2	-----	-----
Sequence 1	REEKHDGEP	SRGRSQSEESQEEEHERRREHRREREQEQQPRPQRRQEEEE
Sequence 2	-----	-----
Sequence 1	EEEEWQPRRQRPQSRREEREEREQE	QGSSSGSQGGGDERRQHRERRVHR
Sequence 2	-----P-----R--Q-----QR--G-----R----	-----MLPKEDPELKKCKHKCRDERQFDEQ--QRRDGKQICEEKARERQQ
Sequence 1	EEREQEQDSRSDSRRQRNPYHFS	SNRFQTYRNRNGQIRVLERFNQRTNR
Sequence 2	EE-----S-----NPY-F----F-----G---VLE-F--R---	EEGNSSEESYG-KEQEENPYVFQDEHFESRVKTEEGRVQVLENFTKRSRL
Sequence 1	LENLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFILVVLN	GRATITIVNPKRQV
Sequence 2	L----N-R-----P-T-I-P-H-DA---L-V--GRATIT-V---KR--	LSGIENFRLAILEANPHTFISPAHFDAELVLFVAKGRATITMVREEKRES
Sequence 1	YNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNL	RVAKLAI PINNPGKLYDFYPST
Sequence 2	-N-E-GD--R-PAGT--Y--N-D-N--L---K---P---PG---FY---	FNVEHGDIIRIPAGTPVYMINRDENEKLFIVKILQPV
Sequence 1	TKDQQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIERVLLG	DDELQENЕКQRRGQEQS
Sequence 2	--D--S---FS---LEA---R-E--E-V-G-----	GEDPESFYRAFSWEVLEAALKVRREQLEKVF-GE-----
Sequence 1	HQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSGEGKPS	-----ESGPFNLRSNK
Sequence 2	-Q--G-IV--S---I--L--H-----EG-P-----SGP-NL----	-QSKGSIVKASREKIRALSQHE-----EGPPRIWPFGGESSGPINLLHKH
Sequence 1	PIYSNKFNGFYEITPDINPQFQDLNISLTFTE	INEGALLLPHYNSKAIFI
Sequence 2	P--SN-FG--YE--PD---Q-QDL-----F--I--G----P-YNS-A--I	PSQSNQFGRLYEAHPDDHKQLQDLMLVSFANITKGS
Sequence 1	VVVDEGEGNYELVGIRDQQRQQDEQE	EEYEQGEEEVRRYSKLSKGDVFI
Sequence 2	-VV-EGEG--E-----Q-----S--L--G-VF-	SVVVEGEGFFEMACPHLSSSSGSYQ-----KISARLRGVVVFV
Sequence 1	IPAGHPLSINAS--SNLRLLGFGINANENQRN	FLAGSEDNVIKQLDREVK
Sequence 2	-PAGHP----AS---NL--L-F--NA--N-R--LAG---N-----R--K	APAGHPVAVIASQNNNLQVLCFEVNAHGNSRFPLAG-KGNIVNEFERDAK
Sequence 1	ELTFPGSIEDVERLIKNNQQQSYFANAQPQQQQQ	REKEGRRGRRGPISSIL
Sequence 2	EL-F-----VER--KNQ-Q--F----P----Q-E--GR-GR-----	ELAFNLPSREVERIFKNQDQAFFF---PGPNKQQEEGGRGGRAFE-----
Sequence 1	NALY	----
Sequence 2	----	-----

<i>Pistacia vera</i>
Pistazie
nut; vicillin

Sequence 1: Lup an 1	
Sequence 2: Allergen Pis v 3.0101, Sequence: EF116865	
Sequence identity: 26.82 (173/645)	
Sequence 1	GIGBACBXCNGLTINBETALPINSANGSTIFLISMAKMRVRLPMLILLLG
Sequence 2	-----
Sequence 1	VVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKEREEEEHEPRQQPRPRQQEEQEREHR
Sequence 2	-----
Sequence 1	REEKHDGEPGRSRGSRQSEESQEEEHERRREHHREREQEQQPRPQRRQEEEE
	---K-D-E-----Q-----E-----E-----R-QEEEE
Sequence 2	---KTDPELKQCKHQCKVQRYDEEQKEQCAKGCEKYYKEKKGREQEEEE
Sequence 1	EEEEWQPRRQRPQ--SRREEREEREQEQQSSSGSQRGGGDER-----
	EEE-W---R-R---S--E--E-R-----Q-GG-----
Sequence 2	EEE-WSGRGRGDEFSTHEPGEKRLSQCMKQCERQDGGQQKQLCRFRCQE
Sequence 1	RQHRERRVH---REEREQEQDSRSDSRRQRNPYHFSSNRFTYYRNRNGQ
	---ERR-H---R-E-E-E-----NPY-F---F-T-----G-
Sequence 2	KYKKERREHSYSRDEEEEEEGDEEQEEEDENPYVFEDEHFTTRVKTEQ GK
Sequence 1	IRVLERFNQRTNRLNLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFILVVLNGR
	--VL--F--R---L--L--YR-----P-----P-H-DAD-I--V--GR
Sequence 2	VVVLPKFTKRSLRLRGLEKYRLAFLVANPQAFVVPNHMDADSIFVSWGR
Sequence 1	ATITIVNPDKRQVYNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVAKLAIP I
	-TIT-----KR---N--QGD--R--AGT--YI-N-D-N--L---KL--P-
Sequence 2	GTITKIRENKRESMNVKQGDIIIRIRAGTPFYIVNTDENEKLYIVKLLQPV
Sequence 1	NNPGKLYDFYPSTTKDQQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIERVLLGDDEL
	N-PG---F-----S---FS---LEA---T-----E-----
Sequence 2	NLPGHYEVFHGPGGENPESFYRAFSREVLEAALKTPRDKLEKLF-----
Sequence 1	QENEKQRRGQEQSHQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSG---EGKPSES
	---EKQ-----DEG-IV--SK-QI-----S-----GK----
Sequence 2	---EKQ-----DEGAIVKASKEQIRAMSRRGEGPSIWPFTGKST--
Sequence 1	GPFNLRSNKPIYSNKFNGFYETPDINPQFQDLNISLTFTEINEGALLLP
	G-FNL----P--SN--G---E-----P--Q-L-I-----I--G----P
Sequence 2	GTFNLFKKDPSQSNNYQGLFESEFKDYPLQELDIMVSYVNITKGGMSGP
Sequence 1	HYNSKAI FIVVVDEGEGNYELVGIRDQQRQQDEQEEYEQGEEEVRRYSD
	-YNS-A--I--V--GEG--E-----QE-----G-----S-
Sequence 2	FYNSRATKIAIVVSGEGRLEIACPHLSSSKNSGQEK---SGPS-YKKLSS
Sequence 1	KLSKGDVFIIPAGHPLSINASSN--LRLLGFGINANENQRNFLAGSEDNV
	-----VF--PAGHP----AS-N--L--L-F--NA--N-R--LAG---N-
Sequence 2	SIRTDVVFVPAGHPFVTVASGNQNLLEILCFEVNAEGNIRYTLAGKK-NI
Sequence 1	IKQLDREVKELTFPGSIEDVERLIKNNQQQSYFANAQP--QQQQQREKEGR
	I-----E-KEL-F----E-V-----Q----F-----Q-QQ-R--E--
Sequence 2	IEVMEKEAKELAFKTKGEEVDKVFGKQDEEFFFGPKWRQHQQGRADE--
Sequence 1	RGRRGPISSIILNALY

Sequence 2	-----

<i>Anacardium occidentale</i>
Cashew Kerne
nut; vicilin-like protein

Sequence 1: Lup an 1	
Sequence 2: Allergen Ana o 1.0102, Sequence: AAM73729	
Sequence identity: 24.96 (161/645)	
Sequence 1	GIGBACBXCNGLTINBETALPINSANGSTIFLISMAKMRVRLPMLILLG
Sequence 2	-----
Sequence 1	VVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKEREEEEHEPRQQPRPRQEEQEREHR
Sequence 2	-----PPTKFSFSLFLVSVLVLCIGF
Sequence 1	REEKHDGEPGRGRSQSEESQEEHERRREHRREREQEQPRPRQRRQEEEE
Sequence 2	---K-D-E-----Q-----E-E-----R--E-EE
Sequence 1	ALAKIDPELKQCKHQCKVQRQYDEQQKEQCVKECEKYKEKKGREREHEE
Sequence 2	-----
Sequence 1	EEEEW-----QPRRQRPQSRREE---REEREQEQGSSSGSQRGGDERR
Sequence 2	EEEEW-----P---P-----R---QE-G-----R---ER-
Sequence 1	QHRERRVHREEREQEQDSRSD--SRRQRNPYHFSSNRFTYRNRNGQIR
Sequence 2	---ER--H---RE---D---D-----NPY-F----F-T-----G---
Sequence 1	K-KERGQHNYKREDEDEDEDEAEEEDENPYVFEDEDFTTKVKTEQGKV
Sequence 2	-----
Sequence 1	VLERFNQRTNRLNLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSDADFILVVLNGRAT
Sequence 2	-L--F-Q---L--L--YR-----P-----P-H-DAD-I--V--GR-T
Sequence 1	ITIVNPDKRQVYNLEQGDALRLPAGTTSYILNPDDNQNLRVAKLAIPINN
Sequence 2	IT-----KR---N--QGD-----GT--YI-N-D-N--L-----P-N-
Sequence 1	ITKILENKRESINVRQGDIVSISSTPFYIANNDENEKLYLVQFLRPVNL
Sequence 2	-----
Sequence 1	PGKLYDFYPSTTKDQQSYFSGFSKNTLEATFNTRYEEIERVLLGDELQEQ
Sequence 2	PG---F-----S---FS---LEA---T-----E-----
Sequence 1	PGHFEVFGPGGENPESFYRAFSWEILEAALKTSKDTLEKLF-----
Sequence 2	-----
Sequence 1	NEKQRRGQEQSHQDEGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSGEGKPSSES-GPFN
Sequence 2	-EKQ-----D-G-I---SK-Q-----ES-G-F-
Sequence 1	LRSNKPIYSNKFGNFYEITPDINPQFQDLNISLTFTEINEGALLLPHYNS
Sequence 2	L----P--SNK-G---E-----P----L-----I--G---P-YN
Sequence 1	KAIFIVVDEGEGNYELVGIRDQRRQDEQEEYEQGEVEVRRYSKLSK
Sequence 2	-A--I--V--GEG--E-----Y-----R-----K
Sequence 1	RATKIAIVVSGEGCVEIAC--PHLSSSKSSHPSYKKLRARIR-----K
Sequence 2	-----
Sequence 1	GDVFIIPAGHPLSINASS--NLRLLGFGINANENQRNFLAGSEDNVIKQL
Sequence 2	--VFI--PAGHP---AS---NL---F--NA--N-R--LAG---N-IK--
Sequence 1	DTVFIVPAGHPFATVASGNENLEIVCFEVNAEGNIRYTLAGKK-NIIKVM
Sequence 2	-----
Sequence 1	DREVKELTFPGSIEDVERLIKNOQQSYFANAQPPQQQQQREKEGRRGRGP
Sequence 2	--E-KEL-F---E-V-----Q---F---P-----EKEGR-----
Sequence 1	EKEAKELAFKMEGEEVDKVFQKQDEEFFFGG-PEWR--KEKEGRADE---
Sequence 2	-----
Sequence 1	ISSILNALY
Sequence 2	-----
Sequence 1	-----
Sequence 2	-----

<i>Prunus dulcis</i>			
Mandel			
nut; amandin; 11S globulin legumin-like protein			

Sequence 1: Lup an 1

Sequence 2: Allergen Pru du 6, Sequence: 3EHK_A

Sequence identity: 19.22 (124/645)

Sequence 1	GIGBACBXCNGLTINBETALPINSANGSTIFLISMAKMVRVRLPMLILLG -----
Sequence 2	-----
Sequence 1	VVFLLAASIGIAYGEKDFTKNPPKEREEEEHEPRQQPRPROQEEQEREHR -----Q-E-----
Sequence 2	-----ARQSQLSPQNQCQLNQLQAREPDNR IQAEAGQ IETWNFNQ
Sequence 1	REEKHGDGPSRGRSQSEESQEEEHERRREHHREHQEQQP RPQRREQEEE -----G-----Q-----E
Sequence 2	GDFQCAGVAASRITIQRNGLHLPSYSNAPQLIIYIVQGRGVLGAVFSGCPE
Sequence 1	EEEEWQPRRRQPQRSRREERE-EREQEQSSSGSQRGGGDERRQHRRERVH --EE-Q--Q-Q-R-E-E-ER-Q-Q---G-Q-G-----Q-ER---
Sequence 2	TFEESQSSQ--QGROQE QE QEROQQQQGEQGRQQG--QEQQQERQGR
Sequence 1	REEREQE QDSRSDSRQRNPYHFSSNRFQTYRNRNGQIRVLERNQRTN ---R-Q---R----Q-----R-Q-----Q-R-L-R--Q-T-
Sequence 2	QQGRQQEEGRQQEQQQGQ----QGRPQ----QQQQFRQLDR-HQKTR
Sequence 1	RLENLQNYRIIEFQSKPNTLILPKHSADFI LVLN GRATITIVNPDKRQ R-----I-----P-----D-D-LV--N-----V--D--Q
Sequence 2	RIREGDVVAI-----PAGVAYWSYNDGDQELVAVN----LFHVSSDHNQ
Sequence 1	VYNLEQGDALRLPAGTTSYLNPDDNQNLRVAKLAIPINNPGK-LYDFYP ---L-Q-----AG-----N--Q-----PG-----F--
Sequence 2	---LDQNPRKFYLAGNPE---NEFNQOGQSQPRQOGEQGRPGQHQQPFGR
Sequence 1	STTKDQQ----SYFSGF SKNTLEATFNTRYEEIERVLLGDDDELQENЕКQ R -----QQ-----FSGF-----L---N---EE--R-L-G-----Q-
Sequence 2	PRQOEQQGNNGNVFSGFNTQLLAQALNVN-EETARNLQGQNDNRNQIIQV
Sequence 1	RGQEQSHQD-EGVIVRVSKKQIQELRKHAQSSSGE-----GKPSESGPFN RG-----Q--G--R-----QE-----GE-----G-----
Sequence 2	RGNLDFVQPPRGRQEREHEERQQEQLOQERQQQGEQLMANGLEETFCSLR
Sequence 1	LRSN--KP----IYSNKFGNFYEITPDINPQFDLNISLTFTEINEGALL L-N--P---I-S--G-----P---L--S-----
Sequence 2	LKENIGNPERADIFS PRAGRISTLNSHNLPILRFLRLSAERGFFYRNGIY
Sequence 1	LPHYNSKAIFIVVVDDEGEGNYELVGIRDQORQQDEQEEYEYQGEVEVRRY -PH-N-A--V-V-G-----V-----E-G-----
Sequence 2	SPHWNVNAHSVYVIRGNARVQVN-----ENGDAILL---
Sequence 1	SDKLSKGDVFII PAGHPLSINASSNLRL LGFINANENQR-NFLAGSEDN -----G-FI-P-H--I---N---F-----EN--N-LAG----
Sequence 2	DQEVQQGQLFIVPQNHGVIQQAGNQGFYFAFKTEENAFINTLAG-RTS
Sequence 1	VIKQLDREVKELTFPGSIEDVERLIKNOQQSYFANAQPQQQQQREKEGRR ---L--EV-----S-E---L--N-Q-----A---QQ-R-----
Sequence 2	FLRALPDEVLANAYQISREQARQLKYNRQETI---ALSSSQRRRAVV---
Sequence 1	GRRGPISILNALY -----
Sequence 2	-----

8.5 Metabolische Untersuchungen

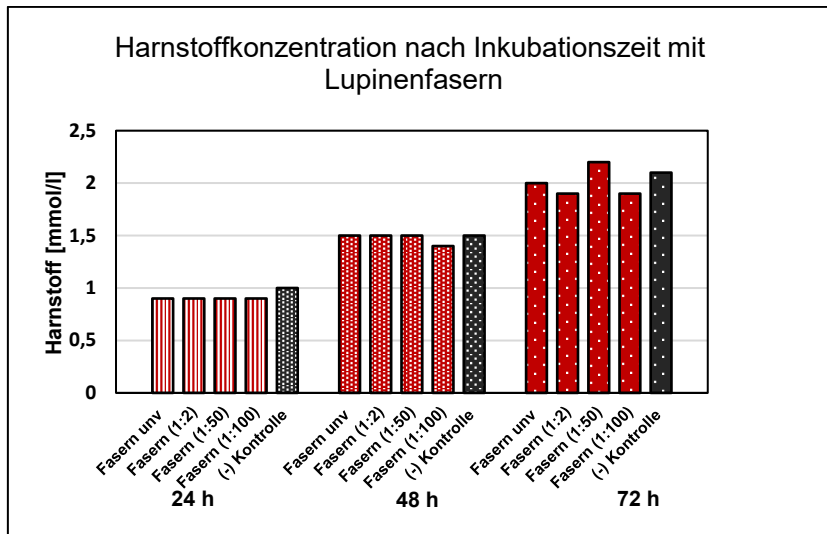


Abb. 36 Einfluss der Lupinenfasern auf die Harnstoffkonzentration nach Inkubationszeit von 24, 48 und 72 h. Fasern unv.: Lupinenfasern unverdünnte Probe (3102 µg/ml); Fasern (1:2): 1551 µg/ml; Fasern (1:50): 62,04 µg/ml; Fasern (1:100): 31,02 µg/ml; (-) Kontrolle: Zellen + Medium + A. bidest.

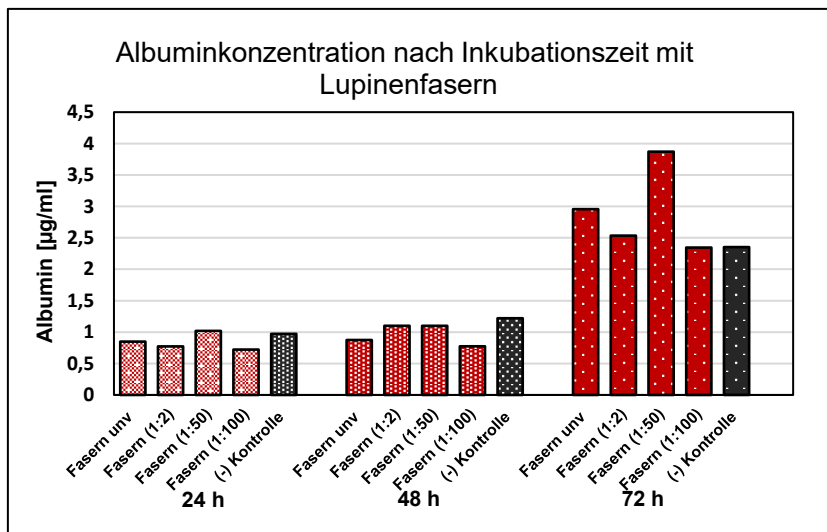


Abb. 37: Einfluss der Lupinenfasern auf die Albuminkonzentration nach Inkubationszeit von 24, 48 und 72 h. Fasern unv.: Lupinenfasern unverdünnte Probe (3102 µg/ml); Fasern (1:2): 1551 µg/ml; Fasern (1:50): 62,04 µg/ml; Fasern (1:100): 31,02 µg/ml; (-) Kontrolle: Zellen + Medium + A. bidest. Die Abb. 37 zeigt eine Hemmung der Albuminbildung in den ersten 24 h nach Zugabe der.

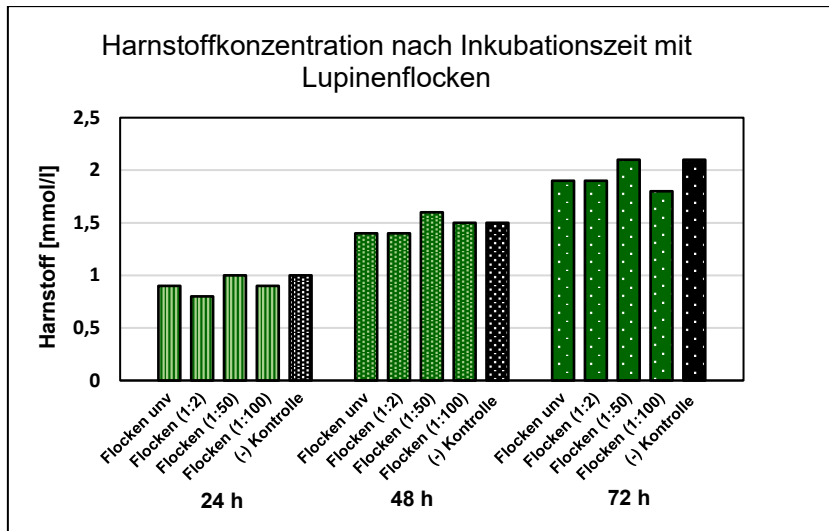


Abb. 38: Einfluss der Lupinenflocken auf die Harnstoffkonzentration nach Inkubationszeit von 24, 48 und 72 h. Flocken unv: Lupinenflocken unverdünnte Probe (8046 $\mu\text{g/ml}$); Flocken (1:2): 4023 $\mu\text{g/ml}$; Flocken (1:50): 160,92 $\mu\text{g/ml}$; Flocken (1:100): 80,46 $\mu\text{g/ml}$; (-) Kontrolle: Zellen + Medium + A. bidest.

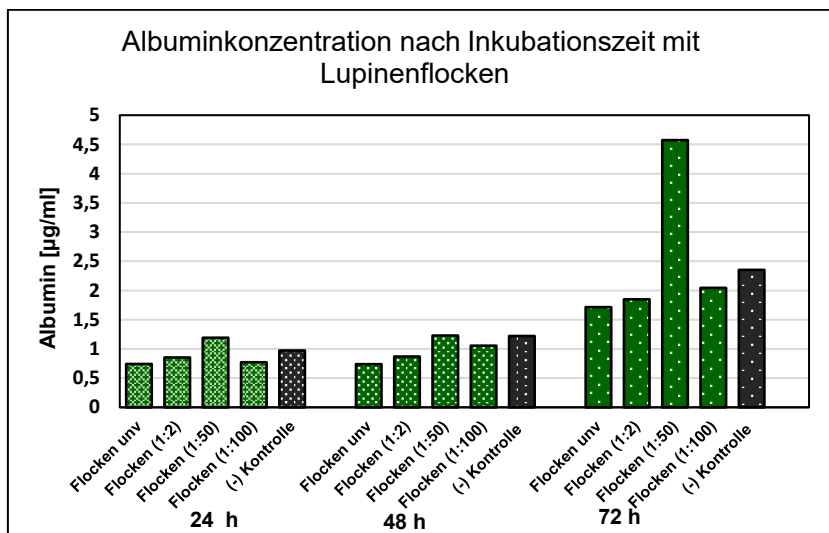


Abb. 39: Einfluss der Lupinenflocken auf die Albuminkonzentration nach Inkubationszeit von 24, 48 und 72 h. Flocken unv: Lupinenflocken unverdünnte Probe (8046 $\mu\text{g/ml}$); Flocken (1:2): 4023 $\mu\text{g/ml}$; Flocken (1:50): 160,92 $\mu\text{g/ml}$; Flocken (1:100): 80,46 $\mu\text{g/ml}$; (-) Kontrolle: Zellen + Medium + A. bidest.

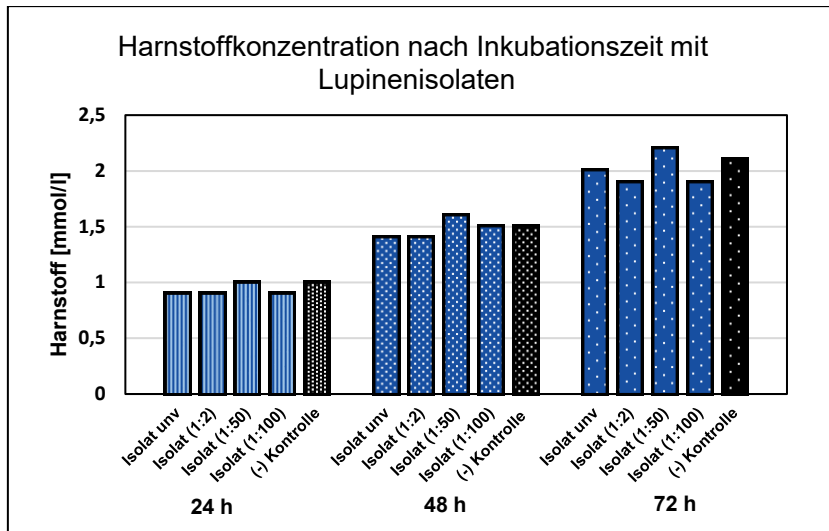


Abb. 40: Einfluss der Lupinenmehlisolat auf die Harnstoffkonzentration nach Inkubationszeit von 24, 48 und 72 h. Isolat unv: Lupinenmehlisolat unverdünnte Probe: 9553 $\mu\text{g/ml}$; Isolat (1:2): 4773 $\mu\text{g/ml}$; Isolat (1:50) 191,06 $\mu\text{g/ml}$; Isolat (1:100): 95,53 $\mu\text{g/ml}$; (-) Kontrolle: Zellen + Medium + A. bidest.

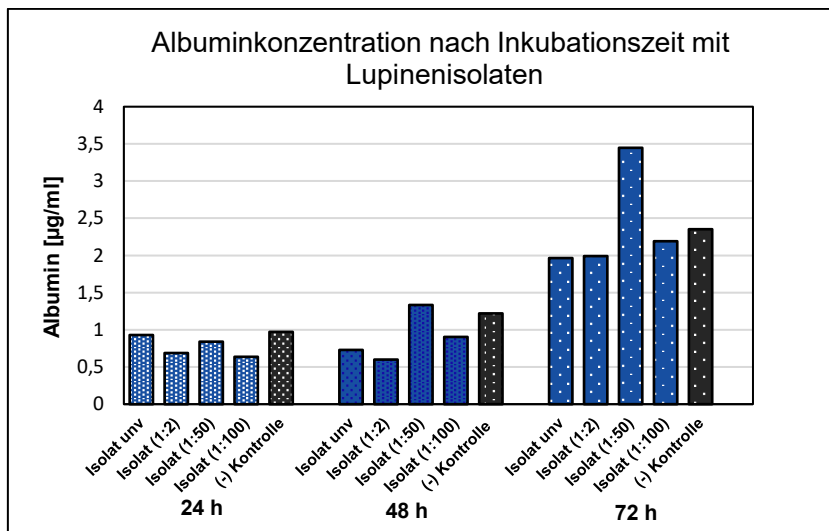


Abb. 41 Einfluss der Lupinenmehlisolat auf die Albuminkonzentration nach Inkubationszeit von 24, 48 und 72 h. Isolat unv: Lupinenmehlisolat unverdünnte Probe: 9553 $\mu\text{g/ml}$; Isolat (1:2): 4773 $\mu\text{g/ml}$; Isolat (1:50) 191,06 $\mu\text{g/ml}$; Isolat (1:100): 95,53 $\mu\text{g/ml}$; (-) Kontrolle: Zellen + Medium + A. bidest.

Ethikvotum Bewertung



Universität Rostock Medizinische Fakultät · PF 10 08 88 · 18055 Rostock

Prof. Dr. med. V. Briese
Universitätsfrauenklinik und Poliklinik
Klinikum Südstadt der Hansestadt Rostock
Südring 81

18059 Rostock

Ethikkommission an der
Medizinischen Fakultät der
Universität Rostock

Vorsitzender:
Prof. Dr. med. Andreas Büttner
andreas.buettner@med.uni-rostock.de
Telefon: +49 381 494-9900

Geschäftsstellenleiterin:
Swaantje Kautz-Kohlschein
kautz@med.uni-rostock.de
Telefon: +49 381 494-9904

Geschäftsstelle:
ethik@med.uni-rostock.de
Telefon: +49 381 494-9939
Fax: +49 381 494-9902
Homepage:
www.ethik.med.uni-rostock.de

Montag, 29. August 2011

Stellungnahme der Ethikkommission

Titel der Studie: Reduktion des allergenen Potentials am Beispiel der Lupine

Antragsteller: Prof. Dr. med. V. Briese, Universitätsfrauenklinik und Poliklinik, Klinikum Südstadt der Hansestadt Rostock

Registriernummer: (Bei Schriftwechsel bitte stets angeben) **A 2011 100**

Eingang Ethikkommission: 22.08.2011

Sehr geehrter Herr Professor Briese,

der Vorsitzende der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock hat die von Ihnen eingereichten Unterlagen im Auftrag der Kommission geprüft. Die Unterlagen liegen der Kommission vollständig vor.

Es bestehen aus **berufsrechtlicher und ethischer Sicht keine Bedenken** gegen die Durchführung des o.g. Forschungsprojektes.

Hinweis: Bitte streichen Sie den Verweis auf das AMG (Patienteneinwilligung), da es sich vorliegend nicht um eine klinische Prüfung nach dem Arzneimittelgesetz handelt.

Wir weisen Sie darauf hin, dass die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters des Projektes und der teilnehmenden Ärzte entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission von dieser Stellungnahme unberührt bleibt.

Die Kommission wünscht Ihnen bei der Durchführung Ihres Forschungsvorhabens viel Erfolg. Für die Übermittlung eines Abschlussberichts wäre Ihnen die Ethikkommission sehr verbunden.

Allgemeine Hinweise:

1. Die ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung dieser klinischen Prüfung verbleibt beim Sponsor, bei der Leiterin/dem Leiter der klinischen Prüfung und bei den Prüferinnen/Prüfern.
2. Zusammensetzung und Arbeitsweise der Ethik-Kommission entsprechen nationalen Gesetzen, Vorschriften und der ICH-GCP-Leitlinie in der jeweils gültigen Fassung.

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. med. A. Büttner
Vorsitzender der Ethikkommission

Swaantje Kautz-Kohlschein
Geschäftsstellenleiterin

Anlage:
Mitgliederliste der Ethikkommission

Mitglieder der Ethikkommission an der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

- Vorsitz: Herr Prof. Dr. med. Andreas Büttner
Facharzt für Rechtsmedizin
- Mitglieder: Frau Dr. med. Barbara Hortian
Facharzt für Physiologie
- Herr Prof. Dr. Günther Kundt
Biometriker
- Herr Dr. jur. Markus Glöckner
Jurist
- Herr Pastor Dr. Dietmar Schicketanz
Krankenhausseelsorger
- Herr Prof. Dr. med. Detlef Schläfke
Facharzt für Nervenheilkunde
- Frau Dr. med. Silke Müller
Facharzt für Klinische Pharmakologie
- Herr PD Dr. med. Carl-Friedrich Classen
Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin
- Herr Dr. med. Michael Bolz
Facharzt für Frauenheilkunde / Geburtshilfe
- Herr Prof. Dr. med. Gerhard Stuhldreier
Facharzt für Chirurgie
Facharzt für Kinderchirurgie
- Frau Dr. med. Kirsten Jost
Fachärztin für Innere Medizin